

(45)発行日 平成12年2月21日(2000.2.21)

(24)登録日 平成11年12月10日(1999.12.10)

(51)Int.Cl.⁷
A 61 K 9/00
47/30

識別記号

F I
A 61 K 9/00
47/30A
C

請求項の数43(全 27 頁)

(21)出願番号 特願平5-515790
 (86) (22)出願日 平成5年3月1日(1993.3.1)
 (65)公表番号 特表平7-507056
 (43)公表日 平成7年8月3日(1995.8.3)
 (86)国際出願番号 PCT/US93/01773
 (87)国際公開番号 WO93/17699
 (87)国際公開日 平成5年9月16日(1993.9.16)
 審査請求日 平成9年4月25日(1997.4.25)
 (31)優先権主張番号 843, 485
 (32)優先日 平成4年2月28日(1992.2.28)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(73)特許権者 99999999
 ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム
 アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウエスト セブンス ストリート 201
 (72)発明者 ハベル, ジエフリー エイ.
 アメリカ合衆国 テキサス 78703, オースティン, ビバリーロード 3006
 (72)発明者 パタク, チャンドラシカーピー.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02154, ウォルサム, スターンズ ヒルロード 3102
 (74)代理人 99999999
 弁理士 山本 秀策

審査官 星野 紹英

最終頁に続く

(54)【発明の名称】組織接触材料および制御放出キャリアとしての光重合性生分解性親水ゲル

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】水溶液中で少なくとも約1g/100mlの溶解度を有する、生分解性、重合性のマクロマーであって、少なくとも1つの水溶性部分、インビボ条件下で非酵素的に加水分解し得る少なくとも1つの分解性部分、および付加的な共有結合を形成してマクロマー連結を生じる能力を有するフリーラジカル重合性末端基を含有し、該重合性末端基が少なくとも1つの該分解性部分によって相互に分離され、該水溶性部分が炭水化物、多糖類、またはタンパク質ではない、マクロマー。

【請求項2】前記水溶性部分が分解性部分に連結し、少なくとも1つの重合性末端基が該水溶性部分に連結し、そして少なくとも1つの重合性末端基が該分解性部分に連結する、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項3】前記水溶性部分が中心コアを形成し、少な

くとも2つの分解性部分が該コアに連結し、そして前記重合性末端基が該分解性部分に連結する、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項4】前記分解性部分が中心コアであり、少なくとも2つの水溶性部分が該コアに連結し、そして1つの重合性末端基が各水溶性部分に連結する、請求項2に記載のマクロマー。

【請求項5】前記水溶性部分がマクロマー骨格であり、前記分解性部分が該マクロマー骨格に連結する分岐またはグラフトであり、そして末端基が該分解性部分に連結する、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項6】前記分解性部分がマクロマー骨格であり、前記水溶性部分が該分解性骨格に連結する分岐またはグラフトであり、そして重合性末端基が該水溶性の分岐またはグラフトに連結する、請求項1に記載のマクロマ

一。

【請求項7】前記水溶性部分が星形骨格であり、前記分解性部分が該水溶性星型骨格に連結する分岐またはグラフトであり、そして少なくとも2つの重合性末端基が分解性の分岐またはグラフトに連結する、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項8】前記分解性部分が星形骨格であり、前記水溶性部分が該分解性星型骨格に連結する分岐またはグラフトであり、そして2つまたはそれ以上の重合性末端基が該水溶性の分岐またはグラフトに連結する、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項9】前記水溶性部分がまた、前記分解性部分である、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項10】前記水溶性部分がまた、前記分解性部分であり、1つまたはそれ以上の付加的な分解性部分が、該水溶性部分のグラフトまたは分岐である、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項11】1つの水溶性コア部分、該コア上の少なくとも2つの分解性伸長部分、および該少なくとも2つの分解性伸長部分上のエンドキャップを含有する請求項1に記載のマクロマーであって、該コアがポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(エチルオキサゾリン)、ポリ(エチレンオキシド)ーポリ(プロピレンオキシド)ブロックコポリマー、およびそれらの組み合わせから選択され、

各伸長部分が生分解性のポリ(α -ヒドロキシ酸)またはポリラクトンを含有し；そして、各エンドキャップがアクリレートオリゴマーまたはモノマーを含有する、マクロマー。

【請求項12】前記ポリ(エレングルコール)が、約400と約30,000ダルトンとの間の分子量を有し；前記ポリ(α -ヒドロキシ酸)オリゴマーが、約200と約1200ダルトンとの間の分子量を有し；そして前記アクリレートオリゴマーまたはモノマーが、約50と約200ダルトンとの間の分子量を有する、請求項11に記載のマクロマー。

【請求項13】前記ポリ(エレングルコール)オリゴマーが、約10,000ダルトンの分子量を有し；前記ポリ(α -ヒドロキシ酸)オリゴマーが、約250ダルトンの分子量を有し；そして前記アクリレートオリゴマーが、約100ダルトンの分子量を有する、請求項12に記載のマクロマー。

【請求項14】前記重合性末端基が、マクロマーを架橋および重合し得る、炭素ー炭素二重結合を含む、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項15】前記マクロマーの架橋および重合が、共触媒の存在下または非存在下で、光感応性フリーラジカル重合開始剤により開始され得、さらに、フリーラジカル重合開始剤を含有する、請求項1に記載のマクロマ

ー。

【請求項16】前記開始剤が、アミン、染料、カンファーキノン、およびアセトフェノンからなる群から選択される、請求項15に記載のマクロマー。

【請求項17】前記開始剤が、トリエタノールアミンを伴うエオシン染料、トリエタノールアミンを伴うエチルエオシン染料、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、および2-メトキシ-2-フェニルアセトフェノンからなる群から選択される、請求項16に記載のマクロマー。

【請求項18】前記架橋または重合が、320nmまたはそれより長い波長を有する光により、インサイチュで開始され得る、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項19】前記分解性部分が、ポリ(α -ヒドロキシ酸)、ポリ(ラクトン)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(オルトエステル)、およびポリ(ホスホエステル)からなる群から選択される、請求項1または11に記載のマクロマー。

【請求項20】前記ポリ(α -ヒドロキシ酸)が、ポリ(グリコール酸)、ポリ(DL-乳酸)およびポリ(L-乳酸)からなる群から選択される、請求項19に記載のマクロマー。

【請求項21】前記ポリ(ラクトン)が、ポリ(ϵ -カプロラクトン)、ポリ(δ -バレロラクトン)またはポリ(λ -ブチロラクトン)からなる群から選択される、請求項19に記載のマクロマー。

【請求項22】前記水溶性部分が、ポリ(エレングルコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(エチルオキサゾリン)、ポリ(エチレンオキシド)ーポリ(プロピレンオキシド)ブロックコポリマー、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項23】タンパク質、炭水化物、核酸、有機分子、および無機の生物学的に活性な分子からなる群から選択される、生物学的に活性な分子、細胞、組織および組織凝集物をさらに含有する、請求項1に記載のマクロマー。

【請求項24】被験者の医療状態を処置する方法で使用する薬物を調製するための、光感応性フリーラジカル重合開始剤、および請求項1に記載の水溶性、生分解性、重合性のマクロマーを含む水溶液であって、該方法が、該溶液で被験者の組織表面をコートする工程；そしてコートされた組織表面を該マクロマーを重合するに十分な光に曝露する工程を包含する、水溶液。

【請求項25】前記水溶性、生分解性、重合性のマクロマーが、1つのコア、該コア上の少なくとも2つの伸長部分、および少なくとも2つの伸長部分上のエンドキャップを含み；該コアが、親水性ポリマーまたはオリゴマーであり；各伸長部分が、生分解性オリゴマーまたはモ

ノマーであり；そして各エンドキャップが、マクロマーを架橋および重合し得るオリゴマーまたはモノマーである、請求項24に記載の水溶液。

【請求項26】前記水溶性、生分解性、重合性のマクロマーが、炭素-炭素二重結合を有する付加された化合物を含有する、請求項24に記載の水溶液。

【請求項27】前記医療状態が、再狭窄、組織付着の防止、他の組織に付着されるべき組織の必要性、出血組織、骨欠損症、動脈瘤、および支持を必要とする器官または組織から選択される、請求項24に記載の水溶液。

【請求項28】被験者の組織表面に生物学的に活性な物質を局所的に適用し、および／または制御可能に放出する方法に用いる薬物を調製するためのコーティング混合物を形成する水溶液であって、光感応性フリーラジカル重合開始剤および請求項1に記載の水溶性、生分解性、重合性のマクロマーを含有し、該方法が、該生物学的に活性な物質を該水溶液と混合する工程、および該溶液を、該マクロマーを重合するに十分な光に曝露する工程を包含する、水溶液。

【請求項29】前記生物学的に活性な物質が、酵素、抗生物質、抗腫瘍形成剤、神經伝達物質、局部麻酔薬、ホルモン、抗体、精神活性剤、生殖器官に作用する薬物、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項28に記載の水溶液。

【請求項30】請求項1に記載の、水溶性、生分解性、重合性のマクロマー、光開始剤または光開始剤／共触媒混合物の水性混合物であって、薬剤の調製に用いられ、該薬物が、組織付着が所望される組織表面へ該混合物を適用し、該組織表面と付着が所望される組織とを接触させ、組織接合を形成させ、そして組織接合を光に照射することにより、被験者の組織表面への組織付着を誘発するかまたは組織表面を覆うための薬物である、水性混合物。

【請求項31】前記マクロマーが、コラーゲンおよび重合性エンドキャップ、またはゼラチンおよび重合性エンドキャップを含有する、請求項30に記載の水性混合物。

【請求項32】制御送達または包括のための生物学的に活性な物質を被験者の処置のためにカプセル化する方法であり、以下の工程；

生物学的に活性な物質と、光感応性フリーラジカル重合開始剤および請求項1に記載の水溶性、生分解性、重合性のマクロマーを含有する水溶液とを混合する工程；および

該溶液を、シート、ロッド、スフェア、マイクロパーティクル、またはナノパーティクルとして該マクロマーを重合するに十分な光に曝露する工程、を包含する、方法。

【請求項33】前記マクロマーが、ポリ(エチレンギリコール)の親水性コアを有する、請求項32に記載の方法。

【請求項34】前記マクロマーが、アクリレートまたはメタクリレートエンドキャップを有する α -ヒドロキシ酸の2つのオリゴマーで伸長される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】組織に付与され、そしてその上で重合して再狭窄または組織粘着を阻害する、請求項24に記載の溶液。

【請求項36】適用され、そして重合し密封剤を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項37】適用され、そして重合して出血器官または骨欠陥のための密封剤を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項38】適用され、そして重合して体内に組織支持を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項39】前記重合した溶液が、制御された時間の間、固定された位置に、器官、血管または脈管を支持するための支持を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項40】適用され、そして重合して動脈瘤のための空間充填剤を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項41】適用され、そして重合して脈管瘤のための空間充填剤を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項42】適用され、そして重合して付着物を形成する、請求項24に記載の溶液。

【請求項43】少なくとも2つの組織表面に適用され、そして重合して該組織表面を互いに付着させる付着物を形成する、請求項24に記載の溶液。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、組織接着剤として、および制御された薬物送達において用いるための光重合性生分解性親水ゲルに関する。

発明の背景

本願は、Jeffrey A. Hubbell、Chandrashekhar P. Pathak、およびAmarpreet S. Sawhneyによる、「組織接触材料および制御放出キャリアとしての光重合性生分解性親水ゲル」という名称の、1992年2月28日に出願された米国特許出願第07/843,485号の一部継続出願である。

放出制御キャリアとしての親水ゲル

生体分解可能な親水ゲルは、例えば、ホルモン、酵素、抗生物質、抗腫瘍剤、および細胞懸濁液などの生物学的に活性な物質のためのキャリアであり得る。輸送された種の機能的特性の一時的保存、および局所組織または全身循環へのその種の制御放出が、可能である。親水ゲルマクロマーの適切な選択は、手術、医療診断および治療における種々の適用に適する浸透性、孔サイズおよび分解速度の範囲を有する膜を生成し得る。

接着剤および密封材

フィブリングルは、手術において密封材および接着剤としてヨーロッパで広く用いられてきた(Thompsonら、1988、「フィブリン接着剤：局所的な止血物質としての

その調製、効力および副作用の総説」、Drug Intell. and Clin. Pharm., 22:946;Gibbleら、1990、(1990)、

「フィブリン接着剤：完全な手術用密封材とは？」Transfusion, 30 (8) :741。しかし、それらは血液製剤からの病気の感染に関する懸念により米国ではあまり広く用いられていないかった。合成ポリマーが、接着剤として探索されてきた (Lipatova, 1986、「医療用ポリマー接着剤」、Advances in Polymer science 79:65-93)、しかしこれらの材料は、局所的炎症、細胞毒性、および不十分な生体適合性に関係している。

手術後の付着の防止

腹膜腔および腹膜壁の器官を包む、手術後の付着の形成は、腹部手術の、頻繁に起こる望ましくない結果である。手技および乾燥によって引き起こされる組織への手術上の外傷は、骨盤腔に集まるとする漿液血液性 (タンパク様) の滲出物の放出を起こす (Holtz, G., 1984)。滲出物が、この期間内に吸収または溶解されない場合、この滲出物は、線維芽細胞と共に内部成長し、そしてその後のコラーゲンの沈着が付着形成に通じる。

付着形成を取り除くための多数の方法が試みられ、大抵の場合では、不十分な成功を納めているにすぎない。方法には、腹膜腔の洗浄、薬理学的作用剤の投与、および組織を機械的に分離するためのバリアの適用が含まれる。例えば、Boyersら、(1988) 「ゴアテックス (Gore-Tex) 手術用膜を用いたウサギの手術後の骨盤付着の低減」、Fertil. Steril., 49:1066では、付着の防止においてゴアテックス手術用膜を試験した。付着防止の総説に対しても、Holtz (1984) 「腹膜付着の防止および管理」、Fertil. Steril., 41:497-507を参照のこと。しかし、これらの方法のうち、コスト的に有効であり、そしてインビボでの研究において有効であるものはない。

Poloxamer407の溶液は、付着の治療のために用いられ、一定の成功を納めている。Poloxamerは、エチレンオキシドとプロピレンオキシドとのコポリマーであり、そして水に可溶である；その溶液は、室温で液体である。Steinleitnerら (1991) 「再建手術のためのげっ歯類モデルにおける手術後の付着の形成および再形成の防止のための腹腔内のバリア材料としてのPoloxamer407」、Obstetrics and Gynecology, 77 (1) :48、および、Leachら、(1990) 「Poloxamer407を用いたラット子宮角モデルにおける手術後付着の低減」、Am. J. Obstet. Gynecol., 162 (5) :1317は、腹膜の付着モデルにおいてPoloxamer溶液を試験し、そして統計学的に有意な減少を付着部内に認めた；しかし、それらは、おそらく損傷部位上の限定された付着および保持のために、付着を取り除くことができなかった。

酸化再生セルロースは、付着を防止するために広く用いられ、そしてそれは認可された臨床用製品、すなわち商品名Interceed TC7である。このバリア材料は、ウサギにおいて (Linskyら、1987 「TC-7を用いるウサギ子

宮角モデルにおける付着の低減」、J. Reprod. Med.、32:17;Diamondら、1987 「付着の形成／再形成の病因：再建手術への適用」、Microsurgery、8:103)、およびヒトにおいて (Interceed (TC7) Adhesion Barrier Study Group、1989)、幾分有効であることが示されている。ヘパリンで予備処理すれば、より効果的であることが示されたが、まだ完全には付着を取り除き得なかつた (Diamondら、1991 「ウサギ子宮角モデルにおける付着形成を低減する際のINTERCEED (TC7) とヘパリンの相乗効果」、Fertility and Sterility, 55 (2) :389)。

要するに、いくつかの洗浄／薬物／材料の方法が、探索されているが、これらの方法のうち、付着を取り除き得るものはない。理想的な材料バリアは、それ自信、付着応答を引き起こさず、縫合せずに所定の位置にとどまり (Holtzら、1982 「様々な組織反応性と直径を有する縫合糸による付着誘導」、Int. J. Fert., 27:134)、数週間にわたって分解し、非常に低い程度まで付着を効果的に低減し、そして、数日間適用した局所的な部位に薬物を送達し得る。今日までに開発され、記載された方法のうち、これらの必要性を満たしているものはない。

合成生分解性ポリマー

ポリ乳酸の合成および生分解性が、Kulkarniら、1966 「手術用移植片のためのポリ乳酸」、Arch. Surg.、93:839によって最初に報告されて以来、生分解性ポリマーの分野は急速に発展した。いくつかの他のポリマーは、生分解をすることが知られており、例えば、ポリ無水物およびポリオルトエステルであり、不安定な骨格連結を利用する。これらは、Dombら、1989 Macromolecules, 22:3200; Hellerら、1990 Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems、Chasin, M. および Langer, R. 編、Dekker, New York, 121-161によって報告されている。天然由来物質に分解するポリマーを有することが望ましいので、ポリアミノ酸が、Miyakeら、1974により報告されたように、インビボでの使用のために合成された。これは、 α -ヒドロキシ酸 (すなわち、乳酸、グリコール酸) のポリエステル (Hollandら、1986 Controlled Release, 4:155-180) を用いることを基本とし、閉鎖用具 (縫合糸およびステープル) から薬物送達システムへの範囲の適用のために、その生分解性材料が依然として最も広く用いられている (Smithら、米国特許第4,741,337号; Spilizewskiら、1985 「炎症応答におけるヒドロコルチゾン装填ポリ (dl-ラクチド) フィルムの効果」、J. Control. Rel. 2:197-203)。

ポリマーが分解するのに要する時間は、適切なモノマーを選択することにより合わせられ得る。結晶性の差により、分解速度もまた様々である。これらのポリマーの比較的疎水性の性質によれば、オリゴマーフラグメントが、水溶性であるために充分小さい場合、実際の重量の損失のみが起こる。このため、最初のポリマー分子量が、分解速度に影響する。

分解性ポリマー含有水溶性ポリマー構成要素が、記載されている。Sawhneyら、(1990)「ポリエーテルとの共重合によって親水性が増大したd1-ラクチド、グリコリド、およびε-カプロラクトンの、急速に分解したターポリマー」、J. Biomed. Mater. Res. 24:1397-1411は、ラクチド、グリコリドおよびε-カプロラクトンをPEGと共に重合させて、その親水性と分解速度を増大させた。Caseyら (1987) の米国特許第4, 716, 203号では、5~25重量%の範囲のPEG含有量を用いて、PGA-PEG-PGAブロックコポリマーが合成された。Caseyら (1987) の米国特許第4, 716, 203号ではまた、再び5~25%の範囲のPEGを用いて、PGA-PEGジブロックコポリマーの合成が報告されている。Churchillら (1985) の米国特許第4, 526, 938号では、PEGを有する類似の組成物に基づいて、5,000以上の分子量を有する非架橋化材料が記載された；しかし、これらの材料は、水溶性ではない。Cohnら (1988) J. Biomed. Mater. Res. 22:993-1009では、水中で60%まで膨張するPLA-PEGコポリマーが記載された；これらのポリマーはまた、水に可溶でなく、架橋されていない。これらの材料に共通の特徴は、それらが、水溶性ポリマーと分解性ポリマーを両方用いることであり、そしてそれらが、水に不溶であり、集めて約60%まで膨張することである。

生物学的起源を有する分解性材料は、周知であり、例えば、架橋ゼラチンがある。ヒアルロン酸は、生体医学的適用に対して分解性膨張ポリマーとして、架橋され、そして用いられた (della Valleらの、米国特許第4, 987, 744号、Della Valleら (1991) の、米国特許第4, 957, 744号「トロンボゲン形成性を減少するためのポリマーアイド生体材料の表面修飾」、Polym. Mater. Sci. Eng. 62:731-735)。

制御され薬物放出のための生分解性材料の使用

ほとんどの親水性薬物は、有機溶媒中に生分解性ポリマーを含む溶液内で懸濁液として機械的に分散される。タンパク質分子および酵素分子のコンホメーションは、水性媒体中に存在するよりもこれらの環境下でしばしば異なっている。そのような疎水性マトリックス中に分散した酵素は、酵素が周りの水性環境下に放出されて、統一してポリマーが分解されるまで、通常、不活性なコンホメーションで存在する。さらに、ある種のタンパク質は、そのポリマー内にタンパク質を分散する際に用いられた有機溶媒と接触することによって、不可逆的に変性され得る。

ポリマーの合成、分解および局所合成

短期間の巨大分子薬物放出を一般に示唆する急速分解ポリマーは、局所的濃度の潜在的に危険な酸性の分解副産物を生じ得る。さらに、今まで報告された全ての生分解性合成ポリマーは、有機溶媒中で製造されるのみであり得、そして全ての生分解性ポリマーは、インビボで重合されにくい条件下で合成される。従って、精密に適合

したバリア、成形品、または局所組織に生物活性材料を送達し得る膜のような移植可能な材料を製造することは不可能である。

従って、本発明の目的は、生体適合性、生分解性であり、そしてインビボでの重合によって急速に形成され得る親水ゲルを提供することである。

本発明のさらなる目的は、手術または外来患者の処置の間に投与され得、そして組織接着剤、組織被包媒体、組織支持体、または薬物送達媒体として重合され得るマクロマー溶液を提供することである。

本発明のよりさらなる目的は、非常に短時間で、そして非常に薄い、すなわち極薄の層で、インビボで重合され得るマクロマー溶液を提供することである。

発明の要旨

本明細書において、インビボで種々の用途を有し、生体適合性、生分解性、重合性であり、かつ少なくとも実質的に水溶性のマクロマーを開示する。このマクロマーは、少なくとも1つの水溶性部分、少なくとも1つの生分解性部分（通常は、加水分解による）、および少なくとも2つのフリーラジカル重合性部分を含む。上記部分は、いくつかの実施態様では、水溶性であり、かつ生分解性であり得る。このマクロマーは、例えば、光感応性化学薬品または染料により生じたフリーラジカルに対して、上記重合性部分を曝すことによって重合される。

このマクロマーの重要な性状は、上記重合性部分が、少なくとも1つの分解性部分によって分離されて、インビボで均一な分解を促進することである。いくつかの変形例が、これらポリマーに存在する。例えば、上記重合性部分は、重合性部分が分解性区域により分離される限り、直接的に、または、水溶性非分解性区域を介して間接的に、分解性伸長部に連結し得る。例えば、このマクロマーが、分解性部分に結合した単一の水溶性部分を含む場合、一方の重合性部分は、この水溶性部分に連結され得、そして他方の重合性部分は、分解性伸長部または部分に連結し得る。別の実施態様において、上記水溶性部分は、このマクロマーの中心コアを形成し、そしてコアに連結する少なくとも2つの分解性部分を有する。少なくとも2つの重合性部分が上記分解性部分に連結し、その結果、分解時にこれら重合性部分（特に、重合化ゲル形内の重合性部分）は、分離される。逆に、このマクロマーの中心コアが分解性部分により形成される場合、少なくとも2つの水溶性部分は、このコアに連結され得、そして重合性部分は、各水溶性部分に連結され得る。ゲル形成させ、そしてインビボでの分解条件に曝した後の最終的な結果は同じである。さらに別の実施態様において、このマクロマーは、水溶性骨格部分およびこのマクロマー骨格に結合した分解性部分を有する。少なくとも2つの重合性部分が上記分解性部分に連結され、その結果、分解時にそれらは分解され、ゲル生成物の溶解を生じる。さらなる実施態様において、このマクロマ

一骨格は、分解性骨格に連結する、分枝またはグラフトとしての水溶性部分を有する非分解性骨格から形成される。2つまたはそれ以上の重合性部分は、上記水溶性分枝またはグラフトに連結される。別の変形例において、上記骨格は、星形に形成され得、水溶性部分、生分解性部分またはさらに生分解性である水溶性部分を含み得る。この一般的な実施態様において、上記星形部分は、水溶性または生分解性の分枝またはグラフトであって、重合性部分が連結したもののが含まれる。さらに、上記重合性部分は、分解性部分によりいくつかのポイントで分離される。

このマクロマーの実施例は、PEG-オリゴグリコリーアクリレートである。適切なエンドキャップの選択は、急速な重合化およびゲル化を可能にする；アクリレートはいくつかの開始システム、例えば、エオシン染料を用いて、紫外線または可視光への短時間の露光により重合され得るので、アクリレートが選択された。ポリ(エチレンギリコール)またはPEGの中心構造単位(コア)は、優れた生体適合性に加えて、その高い親水性および水溶性により選択された。短いオリゴまたはポリ(α -ヒドロキシ酸)、例えば、ポリグリコール酸は、それがエステル結合の加水分解によりグリコール酸(無害の代謝産物)に急速に分解されるので、好ましい鎖伸長部(chain extension)として選択された。高結晶性ポリグリコール酸は、水および大部分の一般的な有機溶媒には不溶性であるが、マクロマー全体は水溶性であり、そして水性組織液と接触しながら、生分解性網目構造に急速にゲル化され得る。このような網目構造は、水溶性薬物および酵素をトラップし、均質に分散させるのに用いられ得、そしてこれらを制御された速度で送達するのに用いられ得る。この網目構造は、不溶性薬物の微粒子懸濁物をトラップするのに用いられ得る。他の好ましい鎖伸長部は、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリオルトエステルおよびポリ無水物である。ポリペプチドもまた用いられ得る。このような「ポリマー性」ブロックには、ダイマー性、トリマー性、およびオリゴマー性ブロックが含まれると理解されるべきである。

ポリマーの水溶性部分は、水の、ポリマー内にトラップされた材料へのアクセスを可能にするので、これらの材料は、制御された薬物送達(特に、親水性材料の薬物送達)に特に有用である。さらに、材料を含むマクロマーを重合させて、材料を有機溶媒に曝さずにトラップすることが可能である。放出は、分解前にポリマーからの材料の拡散により、および/または、分解時に、ポリマーからの材料の拡散により、ポリマー内の特徴的な孔サイズに依存して起こり得る。これは、架橋間の分子量および架橋密度により制御される。トラップされた材料の不活性化は、ゲルの固定化および保護化効果によって減少し、そして他の制御された排出システムに關係するカタストロフィ破裂の影響は回避される。トラップされた

材料が酵素の場合、酵素は、トラップされている間に基質に対し曝され得る。ただし、ゲルの比率は、基質がゲルを透過し得るように選択される。ポリマーの分解は、インビボでの遊離巨大分子の最終的な制御された放出を、末端エステル結合を徐々に加水分解することによって促進する。

これらマクロマーの利点は、マクロマーが水性環境下で急速に重合し得ることである。従って、精密に適合し、半透過性で生分解性のフィルムまたは膜は、組織上でインサイチュ(in situ)に形成され得、生分解性のバリヤとして、生細胞または他の生物学的に活性な物質のキャリアとして、および手術用接着剤として役立つ。特に好ましい実施態様において、マクロマーは、開始剤を結合して組織に適用し、そして重合せて、極薄のコーティングを形成させる。これは、再狭窄の心配のある血管などの組織管腔の内側にコーティングを形成するのに特に有用であり、そして手術中に組織バリヤーを形成して、これにより付着の形成を防止するのに特に有用である。

実施例は、ラット盲腸およびウサギ子宮角のモデルにおける手術後の手術上の付着を防止するために、これらマクロマーおよびポリマーの使用を実証している。このポリマーは、移植されたサンプル上で最少の線維性過形成により見られるように、優れた生体適合性を示す。モデルに対する親水ゲルは、長波長の紫外線(LWUV)に対する短時間の露光により、水溶性前駆体からインサイチュにゲル化され、組織のタンパク質およびグリコサミノグリカン成分と親水ゲルとの相互浸透性網目構造を形成する。この分解性親水ゲルは、それ自身によりまたはtPAと組み合わせて、付着を防止するのに非常に有効である。

図面の簡単な説明

図1は、図式的に例示した本発明のマクロマーを示し、ここで、

はPEGのような可溶性コアである；

はポリグリコール酸のような加水分解性伸長部である；

はアクリレートのような重合性エンドキャップまたは側鎖である；および

はヒアルロネートのような水溶性および加水分解性部分である。

図1Aは、NMRにより計算され、見出された光重合度(d_p)を示す。

図2Aは、PEG18.5K-グリコリドジアクリレート(18.5KG)でコートされたカバーガラス上で6時間培養したヒト包皮線維芽細胞を示す。

図2Bは、PEGでコートされていないカバーガラス上で

6時間培養したヒト包皮線維芽細胞を示す。

図3Aは、グリコリド伸長部（1KG）親水ゲルを有する、PEG1K（1000分子量PEG）グリコリドジアクリレートからPBSへのBSAの放出を示す。

図3Bは、PEG18.5K-DL-ラクチドテトラアクリレートからPBSへのリゾチームの放出を示す。

図4Aは、PEG1Kラクチドジアクリレート（1KL）親水ゲルからの活性組換えtPAの放出を示す。

図4Bは、PEG4Kグリコリドジアクリレート（4KG）親水ゲルからの活性組換えtPAの放出を示す。

図4Cは、PEG18.5K-グリコリドジアクリレート（18.5KG）親水ゲルからPBSへの活性組換えtPAの放出を示す。

図5Aは、コントロールとして用いたウサギ子宮角の上方図である。66%の付着を有する曲がった角の解剖構造がはつきりしている。これらの角は、それら自身の上に折りたたまれている。

図5Bは、光重合した生分解性親水ゲルであるPEG18.5KLで処置されたウサギ子宮角の上方図である。角の解剖構造は正常であり、肉眼で見える付着バンドはない。

図6Aは、外傷後、未処置の血管の環境走査電子顕微鏡写真（ESEM）である。

図6Bは、外傷後、ポリマーでコートした血管のESEMである。

好ましい実施態様の説明

本明細書において、水溶性部分および生分解性部分の両方、および、フリーラジカル開始によって、好ましくは、可視光または長波長の紫外線の照射を用いる光重合によって、重合される少なくとも2つの部分を含むマクロマーから形成される水溶性生分解性ポリマーが開示される。

マクロマー

一般的な用語として、マクロマーは、水溶性、またはジメチルスルホキシドを添加した水のような水溶液に近いものに溶解するポリマーである。それらは、生分解性部分（好ましくは、インビボ条件下で加水分解性であるもの）、水溶性部分および少なくとも2つの重合性部分を含む3つの成分を有する。これらの構造の例を図1に示す。

図1の構造Aは、水溶性部分

(—)

、互いに付加した水溶性および分解性成分

(- - - -)

を有するマクロマーを示す。各々は、重合性エンドキャップ

(—)

を有する。構造Bは、主要な水溶性成分、またはコア部分

(—)

を示し、それは、分解性または加水分解性成分

(~~~~~)

によりどちらかの末端で伸長し、そして重合性成分

(—)

によりどちらかの末端で終結される。構造Cは、どちらかの末端で重合性成分

(—)

によってキャップ化された水溶性成分

(—)

に結合した中心となる分解性または加水分解性成分

(~~~~~)

を示す。構造Dは、加水分解性成分

(~~~~~)

の多数の分枝を有する中心となる水溶性成分

(—)

を示し、ここで、各加水分解性成分は、重合性成分

(—)

でキャップ化されている。構造Eは、3つの水溶性分枝

(—)

を有する中心となる生分解性加水分解性成分

(~~~~~)

を示し、ここで、各水溶性分枝は、重合性成分

(—)

によりキャップ化されている。構造Fは長い中心となる水溶性および加水分解性成分

(- - - -)

を示し、ここで、各末端は重合性成分

(—)

によりキャップ化されている。構造Gは、両末端を加水分解性成分

(~~~~~)

によってキャップ化されている中心となる水溶性および加水分解性成分

(-----)

を示し、ここで、各加水分解性成分は重合性成分

(=)

によりキャップ化されている。構造Hは、重合性成分

(=)

のエンドキャップまたは分枝を有する中心となる水溶性および分解性または化分解性成分

(-----)

を示す。構造Iは、重合性成分

(=)

によりキャップ化された加水分解性成分

(~~~~~)

により伸長した水溶性分枝を有する、円形状の中心となる水溶性成分

(=)

を示す。最後に、図1の構造Jは、分解性分枝

(~~~~~)

を有する円形状の水溶性コア成分

(=)

を示し、ここで、各分枝は重合性成分

(=)

によりキャップ化されている。

図1に示した種々の構造は、典型例のみである。当業者は、本発明の目的に対して利用され得る、他の多くの可能な組合せを理解する。

「少なくとも実質的に水溶性の」という用語が本明細書中で用いられる。これは、少なくとも約1g/100ml水溶液の溶解性、またはジメチルスルホキシドのような有機溶媒を小量含有する水溶液での溶解性を指す。「重合性の」という用語は、その部分が、付加的な共有結合を形成する能力を有し、マクロマーの相互架橋（例えば、アクリレート型分子の炭素一炭素二重結合）を生じることを意味する。このような重合は、その特色として、フリーラジカル形成（例えば、最終的にフリーラジカルを生成するある種の染料および化学化合物の光子吸収を生じる）によって開始される。

好ましい実施態様において、親水ゲルは生分解性、重合性マクロマーで始まり、マクロマーには、コア、コアの各末端上の伸長部、および、各伸長部上のエンドキャップが含まれる。コアは、親水性ポリマーまたはオリゴ

マーである；各伸長部は、生分解性ポリマーまたはオリゴマーである；および各エンドキャップは、オリゴマー、ダイマーまたはモノマーであり、マクロマーと架橋し得る。特に好ましい実施態様において、コアは、約400Daと約30,000Daとの間の分子量を有する親水性ポリ（エチレングリコール）オリゴマーを含む；各伸長部は、約200Daと約1200Daとの間の分子量を有する生分解性ポリ（ α -ヒドロキシ酸）オリゴマーを含む；および各エンドキャップは、コポリマー間で架橋および重合し得る、約50Daと約200Daとの間の分子量を有するアクリレート型モノマーまたはオリゴマー（すなわち、炭素一炭素二重結合を含む）を含む。さらに詳細には、好ましい実施態様には、約8,000Daと約10,000Daとの間の分子量を有するポリ（エチレングリコール）オリゴマーから成るコア；約250Daの分子量を有するポリ（乳酸）オリゴマーから成る伸長部；および約100Daの分子量を有するアクリレート部分から成るエンドキャップ、が組み入れられる。

コア、伸長部およびエンドキャップのオリゴマーは、均一な組成を有し得るか、または相対的に短い鎖の組合せであること、またはマクロマーの各区域の特定の全体の特徴を保持しながら、最終的な親水ゲル上で所望の性質を特異的に与える相対的に短い鎖または個々の種の組合せであり得ることを、当業者は、理解するだろう。本明細書中で言及したオリゴマーの長さは、2マーから多数のマーまでさまざまであり、用語は、完全体からマクロマーのサブ区域または成分を区別するために用いられる。

水溶性部分

好ましい実施態様において、コア水溶性部分は、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（エチルオキサゾリン）、ポリ（エチレンオキシド）コーポリ（プロピレンオキシド）ブロックコポリマー、ポリサッカライドまたは炭水化物（ヒアルロン酸、デキストラン、ヘパリン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、またはアルギメントなど）、タンパク質（ゼラチン、コラーゲン、アルブミン、オボバブルミンなど）、またはポリアミノ酸から成る。

生分解性部分

生分解性部分は、好ましくは、インビボ条件下で加水分解性である。例えば、加水分解性基は、グリコリド、ラクチド、 ϵ -カプロラクトン、他のヒドロキシ酸のポリマーおよびオリゴマー、そして無毒なまたは体内に正常な代謝産物として存在する物質を生じる他の生物学的分解性ポリマーであり得る。好ましいポリ（ α -ヒドロキシ酸）は、ポリ（グリコール酸）、ポリ（DL-乳酸）およびポリ（L-乳酸）である。他の有用な材料としては、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（オルトエステル）、ポリ（オフファジン）およびポリ（ホスホ

エステル) が挙げられる。例えば、ポリ(ε-カプロラクトン)、ポリ(ε-カプロラクトン)、ポリ(δ-バレロラクトン) およびポリ(ガンマーブチロラクトン) のようなポリラクトンもまた有用である。生分解性部分は、1から実質的に水溶性でない生成物を生じる値までの範囲の重合度を有する。従って、モノマー部分、ダイマー部分、トリマー部分、オリゴマー部分、およびポリマー部分が使用され得る。

生分解性部分は、エステル、ペプチド、無水物、オルトエステル、ホスファジンおよびホスホエステルの結合などの生分解され易い結合を用いて、ポリマーまたはモノマーから構築され得る。

重合性部分

重合性部分は、好ましくは、フリーラジカル生成による光開始反応により重合可能であり、最も好ましくは、可視光または長波長の紫外線の照射において行う。好ましい重合部分は、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、メタクリレート、ジメタクリレート、オリゴメタクリレート(oligomethoacrylates)、または他の生物学的に受容可能な光重合性基である。

光開始反応に加えて、他の開始反応化学が用いられ得る。これらには、例えば、重合部分として使用されるマクロマーを含むイソシアネートまたはイソチオシアネートと共に構成される水およびアミン開始反応が挙げられる。

光開始剤および／または触媒

有用な光開始材は、細胞毒性のないマクロマーを、数分間という短い時間内で、最上に好ましくは数秒間のフリーラジカル生成重合させることによって開始するために用いられ得る開始剤である。LWUVまたは可視光による開始反応に対して選択される開始剤としての好ましい染料は、エチルエオシン、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、他のアセトフェノン誘導体、およびカンファーキノンである。あらゆる場合において、架橋および重合は、例えば、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、またはエチルエオシン($10^{-4} \sim 10^{-2}$ M) およびトリエタノールアミン(0.001~0.1M)の組合せのような光活性化フリーラジカル重合開始剤によって、マクロマー間で開始される。

光開始剤の選択は、光重合性部分に大きく依存する。例えば、マクロマーが少なくとも1つの炭素-炭素二重結合を含むとき、染料による光吸収によって、染料はトリプレット状態を取り、次いでトリプレット状態はアミンと反応して重合を開始するフリーラジカルを形成する。これらの材料と共に使用するのに好ましい染料には、エオシン染料、および2,2-ジメチル-2-フェニルアセトフェノン、2-メトキシ-2-フェニルアセトフェノンおよびカンファーキノンなどの開始剤が挙げられる。このような開始剤を用いて、コポリマーは、例えば、長波長の紫外線によって、または約514nmのレーザー

一光によって、インサイチュで重合され得る。

重合の開始は、約200~700nmの間の波長の光の照射によって成し遂げられ、最も好ましくは320nm以上の長波長紫外域または可視域の光であり、最も好ましくは約514nmまたは365nmの光である。

重合を開始するのに用いられ得る数種の光酸化性および光還元性染料がある。これらには、アクリジン染料(例えば、アクリブリリン)、チアジン染料(例えば、チオニン)、キサンチン染料(例えば、ローズベンガル)、およびフェナジン染料(例えば、メチレンブルー)が挙げられる。これらは、アミン(例えばトリエタノールアミン)、硫黄化合物(例えば RSO_2R')、複素環化合物(例えば、イミダゾール)、エノレート、有機金属化合物、およびN-フェニルグリシンなどの他の化合物のような共触媒と共に使用される。他の開始剤には、カンファーキノンおよびアセトフェノン誘導体が挙げられる。

熱重合開始剤系もまた使用される。37°Cで不安定であり、そして生理学的温度でフリーラジカル重合を開始するような系としては、例えば、テトラメチルエチレンジアミンを伴うまたは欠く過硫酸ナトリウム、トリエタノールアミンを伴うまたは欠く過酸化ベンゾイル、および亜硫酸水素ナトリウムを伴う過硫酸アンモニウムが挙げられる。

マクロマーの適用

外科的付着の防止

好ましい適用は、被験者における手術後の付着の形成を低減させる方法である。この方法は被験者における損傷組織表面を、光感応性フリーラジカル重合開始剤の水溶液および上記のマクロマー溶液でコートする工程を包含する。コートされた組織表面は、マクロマーを重合させるのに十分な光に曝される。光感応性フリーラジカル重合開始剤は、単一化合物(例えば、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン)または色素および共触媒(例えば、エチルエオシンおよびトリエタノールアミン)の組合せであり得る。

制御された薬物送達

第2の好ましい適用は、生物学的に活性な物質を、被験者の組織表面に局所的に塗布する方法に関する。この方法は、生物学的に活性な物質と、光感応性フリーラジカル重合開始剤および上記のマクロマーを含む水溶液とを混合して、コーティング混合物を形成する工程を包含する。組織表面は、このコーティング混合物でコートされ、そしてマクロマーを重合させるのに十分な光に曝される。生物学的に活性な物質は、タンパク質、炭水化物、核酸、および無機および有機の生物学的に活性な分子を含む種々の物質のいずれもあり得る。特定の例としては、酵素、抗生物質、抗腫瘍剤、局所麻酔剤、ホルモン、抗血管形成剤、抗体、神経伝達物質、精神活性剤、生殖器官に作用する薬物、およびアンチセンスオリ

ゴスクレオチドなどのオリゴスクレオチドが挙げられる。

制御された薬物送達方法の変形では、マクロマーは、生物学的に活性な物質と重合し、生物学的に活性な物質を含む微小球体またはナノ粒子を形成する。マクロマー、光重合開始剤、およびカプセル化される薬剤は、水性混合物中で混合される。この混合物の粒子は、標準的な技術を用いて、例えば、エマルジョンを形成するためにオイル中で混合すること、ノズルを用いてオイル中で液滴を形成すること、またはノズルを用いて空気中で液滴を形成することにより形成される。懸濁液または液滴は、アクリマーの光重合に適した光で照射される。

組織接着剤

ポリマーの別の用途は、被験者における組織表面を接着するための方法にある。マクロマーは、光開始剤または光開始剤／共触媒混合物と混合されて水性混合物を形成し、そしてこの混合物は、組織接着が望まれる組織表面に適用される。この組織表面は、粘着が望まれる組織と接触し、組織結合を形成する。次いで、この組織結合は、マクロマーが重合するまで照射される。

組織コーティング

これらマクロマーの特に好ましい適用において、極薄コーティングが組織表面に適用され、最も好ましくは、血管のような組織の管腔に適用される。そのようなコーティングのある種の使用は、血管介入後の再狭窄、急性再閉塞、または血管スパズムの治療または予防にある。

表1:マクロマーの分子量および組成

| PEG分子量 | コモノマー | OH基当りのコモノマーのD, P, ポリマーコード | |
|--------|-----------------------------|---------------------------|----------|
| 20,000 | グリコリド* | 15 | 20KG |
| 18,500 | グリコリド* | 2.5 | 18. 5K |
| 10,000 | グリコリド* | 7 | 10KG |
| 6,000 | グリコリド* | 5 | 6KG |
| 4,000 | グリコリド* | 5 | 4KG |
| 1,000 | グリコリド* | 2 | 1KG |
| 20,000 | DL-ラクリド | 10 | 20KG |
| 18,500 | DL-ラクリド | 10 | 18. 5KL |
| 10,000 | DL-ラクリド | 5 | 10KL |
| 6,000 | DL-ラクリド | 5 | 6KL |
| 1,000 | DL-ラクリド | 2 | 1KL |
| 600 | DL-ラクリド | 1 | 0. 6KL |
| 600 | DL-ラクチド+ラクチド カブロラクトン(CL) | 2; | 0. 6KLCL |
| 18,500 | カブロラクトン(CL) | CL1 | |
| 18,500 | | 2.5 | 18. 5KCL |
| 18,500 | | | 18. 5KCO |

実施例1:光重合された生分解性親水ゲルの合成

PEGベースの親水ゲル

PEGベースの生分解性親水ゲルを水溶性マクロマーの急速レーザーまたはUV光重合により形成した。それに対し、マクロマーを、PEGの末端基にグリコール酸オリゴマーを添加し、次いでアクリル末端基でキップアップすること

光開始剤は、組織の表面に適用され、反応させ、組織に吸収または結合させ、未結合の光開始剤は希釈またはすぎにより除去され、そしてマクロマー溶液は塗布され、重合される。以下に示すように、この方法は、厚さ1ミクロンと500ミクロンの間の、最も好ましくは、薬20ミクロンの、均一なポリマー性コーティングを形成し得る。このコーティングは、血栓症または局所的炎症を引き起こさない。

組織支持体

マクロマーはまた、体内で成形品を形成することにより組織支持体を形成するのに使用され得、機械的機能を提供する。そのような支持体としては、例えば、出血している器官に対する密封材、骨欠損に対する密封材および血管動脈瘤に対する充填材(space-filler)が挙げられる。さらに、そのような支持体としては、制御された時間の間、器官、血管または管を特定の位置に保持する構造が挙げられる。

以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様および有用性を述べるためにあり、本明細書に添付した請求項の記載と別様でなければ、本発明を制限するものではない。同時に、これらの実施例は、現在理解されている発明の実行の最良の形態の代表的な例示を示す。

表1は、実施例中で合成または使用された種々のマクロマーのコード名を、中心となるPEGセグメントの分子量および分解性コモノマーの重合度の観点から見たそれらの組成と共に示す。

とにより合成した。マクロマーのPEG部分は、水溶性の性質を付与し、そして引き続き重合により、細胞-非付着性の親水ゲルが得られる。グリコール酸オリゴマーは、ポリマー網目構造の加水分解性小部分となり、アクリル末端基は、急速重合およびマクロマーのゲル化を促進する。

合成のための調製には、グリコリド (Dupont) または DL-ラクチド (Aldrich) を。エチルアセテートから新たに再結晶化した。種々の分子量のPEGオリゴマー (FlukaまたはPolysciences) を、使用前に110°Cで真空中で乾燥した。アクリロイルクロライド (Aldrich) は、購入したものを用いた。他のすべての化学品は、試薬グレードのものを使用し、さらに精製することなく使用した。

マクロマー合成

250mlの丸底フラスコを、真空および乾燥アルゴンの繰り返しサイクルにより火炎乾燥 (flame dried) した。20gmのPEG (分子量10,000)、150mlのキシレン、10 μ gmのオクタン酸第二スズ (stannous octoate) をフラスコに入れた。このフラスコをアルゴン下、PEGを溶解するため60°Cに加熱し、そして室温まで冷却した。1.16 gmのグリコリドを上記フラスコに添加し、反応混合物を16時間還流した。コポリマーを冷却時に分離し、濾過により回収した。このコポリマー (10K PEG-グリコリド) を、引き続く反応に直接使用した。他のポリマー類を、グリコリドの代わりにDL-ラクチドまたは ϵ -カブロラクトンを用いてそして異なる分子量のPEGを用いて同様に合成した。

光感応性オリゴマー (マクロマー) の合成 :

19gmの10K PEG-グリコリドコポリマーを、150mlのメチレンクロライド中に溶解し、1mlのアクリロイルクロライドおよび1.2mlトリエチルアミンと共に、アルゴン環境下で12時間還流した。固体のトリエチルアミンハイドロクロライドを濾過により分離し、濾液を、大過剰量のヘキサンに添加することによりポリマーを沈殿させた。このポリマー (両端がアクリレートによりキャップされている) をさらに、メチレンクロライド溶解およびヘキサン沈殿の繰り返しにより精製した。

表2は、合成された特定のマクロマーを示す。グリコリド鎖伸長の重合度を低く保ち、全てのポリマーが鎖あたり約10のエステル基、または鎖末端あたり約5のエステル基を有した。これらのポリマーを光重合した時、架橋した三次元の網目構造が得られる。しかし、得られる網目構造中の各鎖セグメントは、「分解」するために、いずれかの末端で、切断されたひとつのエステル結合を必要とする。これらのエステル切断は、この鎖を、周囲の生理的流体中に溶解せしめ、それによって、移植部位から除去される。得られる加水分解産物、PEGおよびグリコール酸は、水溶性であり、そしてほとんど毒性を有していない。

| ポリマーコード | 中心PEG鎖の分子量 | 最端部中のグリコリド% | 最端部中の ϵ -カブロラクトン% | 計算された最端部の分子量 (ダルトン) | 外観 |
|---------------|------------|-------------|----------------------------|---------------------|-------|
| O, 4 K | 400 | 100 | 100 | 580 | 粘稠な液体 |
| 1 K G | 1000 | 100 | 100 | 300 | 白色の固体 |
| 4 K G | 4000 | 100 | 100 | 232 | 白色の固体 |
| 10 K G | 10000 | 100 | 100 | 580 | 白色の固体 |
| 18, 5 K G | 18500 | 100 | 100 | 1160 | 黄色の固体 |
| 18, 5 K G G L | 18500 | 50 | 50 | 580 | 白色の固体 |

表2：合成されたマクロマー

オリゴマー鎖あたりほんの2~3単位のグリコール酸が存在するので、光架橋可能なプレポリマーの溶解特性は、原則的には、中心PEG鎖により決定される。水中およびメチレンクロライド中 (両者ともPEGの溶剤である) のマクロマーの溶解性は、中心PEGセグメントが、1,000ダルトンまたはそれ以上の分子量を有する限り、不利には作用しない。合成されたプリポリマーに対する溶解性データを表3に示す。

表3:溶解性データ

| 溶媒 | 1 KG | 4 KG | 10 KG | 18. 5 KG | TMP* |
|-----------|--------------------------|------|-------|----------|------|
| DMSO | — | ■ | — | ■ | ■ |
| アセトン | — | ■ | ■ | ■ | — |
| メタノール | — | ■ | — | ■ | — |
| 水 | — | — | — | — | ■ |
| ヘキサン | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| メチレンクロライド | — | — | — | — | — |
| 冷キシレン | ■ | ■ | ■ | ■ | — |
| 熱キシレン | — | — | — | — | — |
| ベンゼン | ■ | ■ | ■ | ■ | — |
| — | 可溶 | | | | |
| ■ | 可溶でない | | | | |
| * | トリメチロールプロパングリコリドトリアクリレート | | | | |

異なる重合度を有するDL-ラクチドのPEG鎖を合成し、マクロマーの水溶性が保持され得る置換の程度を測定した。結果を表4に示す。疎水性のDL-ラクトイルまたはアクリレート末端による、親水性のPEG鎖の約20%

を超える置換により、マクロマーは、メチレンクロライドなどの有機溶媒中にはなお溶解性であるが、水に不溶性となる。

表4 : マクロマーの溶解性

| エチレンオキサイドのD, P, * | ラクチドまたはグリコリドのD, P, * | PEG鎖の伸長% | 水中の溶解性 |
|-------------------|----------------------|----------|--------|
| 420 | 4 | 0.1 | 可溶 |
| 420 | 10 | 2.4 | 可溶 |
| 420 | 20 | 4.8 | 可溶 |
| 420 | 40 | 9.5 | 可溶 |
| 420 | 80 | 19 | 不溶 |
| 23 | 2 | 8.7 | 可溶 |
| 23 | 4 | 17.4 | 可溶 |
| 23 | 10 | 43.5 | 不溶 |
| 23 | 40 | 174 | 不溶 |
| 5 | 4 | 80 | 不溶 |
| 10 | 4 | 40 | 可溶 |

* 重合度

光重合

マクロマーを、フリーラジカル開始剤を用いて、急速ゲル化に寄与する、鎖あたり2つのアクリル酸二重結合の存在下で、光重合によるゲル化した。3 μl の開始剤溶液 (n-ビニルピロリドン中の300mg/mlの2,2-ジメトキシ-2-フェニルーアセトフェノン) を含むHEPES緩衝化された塩溶液中の種々の分解性ポリマーの23%W/W溶液を使用した。この溶液100 μl をカバーガラス上に置き、低強度長波長UV (LWUV) ランプ (Blak-Ray, モデル3-100A (フラッド付)) で照射した。ゲル化が起こるのに必要な時間を注記し以下に示す。これらの時間は、代表的には10秒の範囲にある。このことは、これら

の反応が空気中で (UVで開始される光重合反応は、不活性ガス環境下に比べて空気中では遅い) 、そしてポータブルの低出力長波長UV (LWUV) 光源を用いて実施されるので極めて重要である。酸素は、伸長を阻害する種を形成することによりフリーラジカル反応をしばしば阻害するが、上記重合をスローダウンするようではなかった。このような急速な重合は、インサイチュのゲル化を必要とする応用で特に有用である。この急速なゲル化は、マクロマー上の比較的疎水性の重合可能な基間のミセル構造の形成によると考えられ、それによって水性溶液中の重合可能種の局所濃度を増加し、そして重合速度を増加する。

可視レーザー光がまた、重合に有用である。低強度で短時間の露光は、照射が固有の発色団の非存在下で強く吸収されないため、可視レーザー光は実質的に、生細胞に対して無害である。レーザー光はまた、ファイバー光学を用いて輸送され得、極めて小さい領域に集中され得る。このような光は、高度に局所化された領域での急速重合に使用され得る；選択されたブリポリマーのゲル化時間を表5に示す。各場合において、0.2mlの23%w/vの

光感応性オリゴマー溶液を、エチルエオシン (10^{-4} M) およびトリエタノールアミン (0.01~0.1M) と混合し、そしてこの溶液をアルゴンイオンレーザー (514nmで発光するAmerican argon ion laser mod 905) を用いて0.2~0.5W/cm²のパワーで照射する。ビームを直径3mmまで広げ、そして試料をゆっくりとゲル化が起こるまでスキャンした。

表5:ゲル化時間

| ポリマー | UV重合 * | レーザー重合 ** |
|------|--------------------------|--------------|
| | ゲル化時間 (平均±S, D,) (秒) | ゲル化時間 (秒) |
| 1KG | 5.3±4.1 | <1 |
| 4KG | 14.7±0.5 | <1 |
| 6KG | 9.3±0.5 | <1 |
| 10KG | 18.±0.8 | <1 |
| 10KL | 7.7±0.5 | <1 |
| 18KG | 23.3±1.2 | <1 |
| 20KG | 13.3±0.5 | <1 |

* 開始剤:2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、濃度900ppm:0.2mlの23%モノマーPBS溶液

** 514nmで発光するアルゴンイオンレーザー。
パワー3w/cm²:エチロエオシン(ethyloeoisin)、トリエタノールアミン開始システム:0.2mlの23%モノマーPBS溶液

生分解能

得られたポリマー網目構造の生分解は、多くの生物医学的な適用において重要な基準となる。ポリ(グリコール酸)およびポリ(DL-乳酸)の分解は、文献に充分記載されている。この分解は主にエステル結合の加水分解により行われる；反応は2次反応であり、pHにかなり依存する。pH10での速度定数は、pH7.2での速度定数より7倍速い。

ポリ(α -ヒドロキシ酸エステル)は、疎水性で、水に難溶なため、そのような容易に生分解されることは特筆すべき点である。従って、ポリマーマトリックスの水性環境での利用性は限定される。しかし、上記網目構造は、親水ゲルであり、水で膨らむので、網目構造中の全てのエステル結合は、周囲の水性溶媒と一定の触媒を有する。これは、これらのゲルの表面分解よりむしろ一様

なバルク分解を生じる。

表6に、これらの網目構造のいくつかに関する加水分解データを示す；表に挙げた時間は、pH7.2およびpH9.2において60mgのゲルが完全に分解された時間である。記載のように、ほとんどのゲルが、pH9.6で12時間以内に分解する。18.6kゲルは、pH9.6で2.5時間以内に分解されるが、18.5KC0ゲルは、3日間では分解されず、ラクトイルエステル、グリコロイル(glycoloyl)エステルあるいは ϵ -カプロラクトイルエステル部分が、これらの網目構造の分解に関与することが示唆される。18.5KGゲルはまた、4KGゲルよりさらに速く加水分解されることが観察され得る。このことは、後者のゲルの親水性が少ないと、および架橋密度が高いことに帰結され得る。

表6：加水分解データ

| ゲル化に用いた オリゴマー | pH 9, 6でゲルを溶解す るのに要した時間 (h) | pH 7, 2でゲルを溶解す るのに要した時間 (日) |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 4 KG | 6. 2 | 5. 5 |
| 10 KG | 12. 25 | 5. 5 |
| 18. 5 KG | 2. 25 | > 7 |
| 18. 5 KCL | > 5 日 | > 7 |
| 18. 5 KCO | > 5 日 | > 7 |

マクロマーの特徴付け

プレポリマーのFTIRスペクトルは、DIGILABモデルFTS 15/90で記録した。1110cm⁻¹ (PEGのC—O—C吸収に特有) の吸収は、PEGセグメントの存在を示す。強い1760cm⁻¹の吸収は、グリコール酸エステルの存在を示す。3400cm⁻¹付近の水酸基の吸収がなく、1590cm⁻¹付近の弱いアクリル2重結合の吸収が極めて低いことは、末端基でのアクリル2重結合の存在を示す。

500MHzプロトンおよび125MHzカーボン-13スペクトルは、GE500機器で記録された。4.9ppmでの非常に強いピークの存在は、PEGセグメント由来のCH₂メチレンに起因し、5.09ppmのピークは、グリコールエステルセグメントに起因し、そして5.8ppmのアクリルプロトンシングルレットは、プロトンNMRから容易に観察され得る。異なったコポリマーに関するPEGセグメントおよびグリコール酸セグメントの推定分子量を、表2に示す。カーボン-13NMRでのグリコール酸由来の169.39ppmのカルボニルピーク、およびPEGのメチレン炭素由来の36.5ppmのピークは、これらコポリマーの報告されている化学構造に一致する。

示差走査熱量計 (Perkin Elmer DSC-7) が、熱遷移に関してオリゴマーを特徴付けるために用いられた。オリゴマーを、おそらく重合がおこるように、40°Cから200°Cまで20°C/分の速度で熱した。次いでポリマーを60°C/分の速度で-40°Cに冷却し、再び20°C/分の速度で20°Cに熱した。生分解性18.5K PEGグリコリドテトラアクリレート (18.5KG) オリゴマーの最初の走査を、非生分解性18.5K PEGテトラアクリレート (18.5KCO) の走査と比較した。18.5KGには-2°Cでガラス転移が現れ、18.5KCOにはそのような転移は存在しないことが観察された。140°Cでの小さい融解ピークはまた、限定された範囲で結晶化し得る、極僅かなグリコール酸多量体に起因することが明らかである。PEGに関する融解ピークは、18.5KG中では60.7°C (18.5KCOに関する) から57°Cに下方シフトする。このことはおそらく、グリコール酸結合の存在によるPEO結晶構造の妨害に起因する。上記第3サ

イクル (おそらくそのときまでにオリゴマーは重合している) では、グリコリドセグメントのTg転移およびTm転移はもはや観察されず、架橋された網目構造が形成され、グリコール酸セグメントはもはや可動し得ない。

中心に水溶性PEG鎖に加えられ分解性セグメントの重合度 (D.P.) は、¹H NMRを用いる種々の場合で啓呈した。実験的に測定したD.P.は、図1Aに示すように、計算値によく一致することが示された。従って、PEG水酸化物により開始する開環反応は完了へと進み、定量的な収率が得られる。

総含水、自由水、係合水の測定

種々の分解性マクロマー溶液は、上記のように作製した。ディスク形状のゲルは、型を用いて作製した。各々のディスクに400μlの溶液を使用した。充分なゲル化を保証するために、上記溶液に2分間、照射した。ディスク型ゲルを移し、60°Cで2日間減圧乾燥した。ディスク型を重量測定 (W1) し、次いで1日間クロロホルムで繰り返し抽出した。ディスク型を再び乾燥し、重量測定 (W2) した。ゲル画分は、W2/W1で算出した。データを表7に示す。

抽出に次いで、ディスクを6時間、PBSで平衡化し、重量測定した (W3、過剰の水を注意深く拭き取り後)。総含水率は、(W3-W2) × 100/W3で算出した。示差走査熱量計 (DSC) を、ゲル中で利用され得る自由水の量を決定するために使用した。20°C/分の走査速度を用い、水溶融のために吸熱した熱容量を測定した (H1)。HBSの熱容量もまた測定した (H2)。自由水の画分は、H1/H2で算出した。残留水は水素結合により、PEOセグメントに結合すると仮定した。ゲル中の自由水の存在が示された。この自由水は、タンパク質および酵素の天然の構造を維持し、不活化を減少させるそのようなゲル中へタンパク質および酵素がトラップされるのに役立つことが予期され得る。従って、これらのゲルは、生物学的な微小分子の放出を制御するのに適していることが明らかであった。ゲル含水率のデータを表7にまとめる。

表7：親水ゲルの含水率

| ポリマーコード | 自由水 (%) | 結合水 (%) | 総含水 (%) | ゲル含量 (%) |
|---------|---------|---------|------------|-------------|
| 1KG | 68.4 | 14 | 82.3 ± 2.6 | 61.3 ± 5.2 |
| 4KG | 78.0 | 9.3 | 87.3 ± 1.8 | 56.3 ± 0.9 |
| 6KG | 74.8 | 13.4 | 88.1 ± 3.3 | 66.5 ± 2.35 |
| 10KG | 83.7 | 10.8 | 94.5 ± 0.5 | 54.3 ± 0.6 |
| 10KL | 82.0 | 9.7 | 91.7 ± 0.5 | 63.9 ± 3.7 |
| 18.5KG | 71.8 | 22.3 | 94.0 ± 0.4 | 47.0 ± 4.9 |
| 20KG | 79.8 | 14.8 | 94.5 ± 0.4 | 44.5 ± 4.8 |

実施例2:多機能性マクロマーの利用

4種の機能性水溶性PEG (MW18,500) (PEG18.5K) の30gを、ベンゼン中に溶解することにより乾燥し、水ベンゼン共沸混合物を蒸留して取り除いた。グローブバッグ(glove bag) 中で、PEG18.5K20g、グリコリド1.881gおよび、オクタン酸第二スズ15mgを100ml容丸底フラスコに添加した。このフラスコを真空コックでキャップし、シリコンオイルバスに入れ、真空ラインにつないだ。バス温度は200°Cに上げた。反応を200°Cで4時間、および160°Cで2時間行なった。反応混合物を冷却し、ジクロロメタンに溶解した。そしてコポリマーを、過剰量の乾燥エチルエーテルに注いで沈殿させ、0°Cに冷却した500ml容丸底フラスコ中のジクロロメタン200ml中に再溶解した。このフラスコに、トリエチルアミン0.854gおよびアクリロイルクロライド0.514mlを窒素環境下で加え、そして反応混合物を0°Cで12時間攪拌した。トリエチルアミンハイドロクロライドを濾過して分離し、コポリマーをジエチルエーテルに沈殿させることにより濾液から回収した。ポリマーを真空下50°Cで1日間乾燥した。

実施例3:DL-ラクチドを含む光感応性マクロマーの合成

PEG (MW20,000) (PEG20k) をベンゼン中に溶解することにより乾燥し、水ベンゼン共沸混合物を蒸留して取り除いた。グローブバッグ中で、PEG20k32.43g、DL-ラクチド2.335gおよびオクタン酸第二スズ15mgを100ml容丸底フラスコに添加した。このフラスコを真空コックでキャップし、シリコンオイルバスに入れ、真空ラインにつないだ。バス温度は200°Cに上げた。反応を200°Cで4時間行なった。反応混合物を冷却し、ジクロロメタンに溶解した。そしてコポリマーを、過剰量の乾燥エチルエーテルに注いで沈殿させ、0°Cに冷却した500ml容丸底フラスコ中のジクロロメタン200ml中に再溶解した。このフラスコに、トリエチルアミン0.854gおよびアクリロイルクロライド0.514mlを窒素環境下で加え、反応混合物を0°Cで12時間攪拌した。トリエチルアミンハイドロクロライドを濾過して分離し、コポリマーをジエチルエ

| | | | | |
|--------|------|------|------------|-------------|
| 1KG | 68.4 | 14 | 82.3 ± 2.6 | 61.3 ± 5.2 |
| 4KG | 78.0 | 9.3 | 87.3 ± 1.8 | 56.3 ± 0.9 |
| 6KG | 74.8 | 13.4 | 88.1 ± 3.3 | 66.5 ± 2.35 |
| 10KG | 83.7 | 10.8 | 94.5 ± 0.5 | 54.3 ± 0.6 |
| 10KL | 82.0 | 9.7 | 91.7 ± 0.5 | 63.9 ± 3.7 |
| 18.5KG | 71.8 | 22.3 | 94.0 ± 0.4 | 47.0 ± 4.9 |
| 20KG | 79.8 | 14.8 | 94.5 ± 0.4 | 44.5 ± 4.8 |

ゲル化はすべて、HEPESで緩衝化された塩溶液中の18.5KGの23%w/w溶液を用いて行われた。表8から理解され得るように、これらの開始システムは従来の熱開始システムに比較して有利である。特に有用であり得る光重合開始剤は、2-メトキシ-2-フェニルアセトフェノンおよびカンファーキノンである。

実施例4:DL-ラクチドおよびε-カプロラクトンを含む光感応性前駆体の合成

PEG (MW600) (PEG0.6k) をベンゼン中に溶解することにより乾燥し、水ベンゼン共沸混合物を蒸留して取り除いた。グローブバッグ中で、PEG0.6k0.973g、ε-カプロラクトン0.185gと一緒にDL-ラクチド0.467g、およびオクタン酸第二スズ15mgを50ml容丸底フラスコに添加した。このフラスコを真空コックでキャップし、シリコンオイルバスに入れ、真空ラインにつないだ。バス温度は200°Cに上げた。反応を200°Cで4時間、そして160°Cで2時間行なった。反応混合物を冷却し、ジクロロメタンに溶解した。そしてコポリマーを、過剰量の乾燥エチルエーテルに注いで沈殿させ、0°Cに冷却した250ml容丸底フラスコ中のジクロロメタン50ml中に再溶解した。このフラスコに、トリエチルアミン0.854gおよびアクリロイルクロライド0.514mlを窒素環境下で加え、反応混合物を0°Cで12時間攪拌した。トリエチルアミンハイドロクロライドを濾過して分離し、コポリマーをジエチルエーテルに沈殿させることにより濾液から回収した。ポリマーを真空下50°Cで1日間乾燥し、室温で液体とした。

実施例5:光重合に用いる染料の選択

開始剤として多様な染料、および効果的な共触媒として多くの電子供与体を用いて光重合を開始することができる。表8に、異なる広範囲の波長で吸収のある発色團を有する、幾多の染料により開始される光重合を例示する。ゲル化はすべて、HEPESで緩衝化された塩溶液中の18.5KGの23%w/w溶液を用いて行われた。表8から理解され得るように、これらの開始システムは従来の熱開始システムに比較して有利である。特に有用であり得る光重合開始剤は、2-メトキシ-2-フェニルアセトフェノンおよびカンファーキノンである。

表8：18. 5KG PEGの重合誘導

| 開始剤 | 光源* | 温度(°C) | ゲル時間(秒) |
|--|------------------|--------|---------|
| エオシンY, 0.00015M ; トリエタノールアミン, 0.65M | S1 (UVフィルター付) | 25 | 10 |
| エオシンY, 0.00015M ; トリエタノールアミン, 0.65M | S4 | 25 | 0.1 |
| メチレンブルー, 0.00024M ; p-トルエンスルフィン酸, 0.0048M | S3 | 25 | 120 |
| 2,2-ジメトキシ-2-フェニル アセトフェノン, 900ppm | S2 | 25 | 8 |
| 温硫酸カリウム 0.0168M | — | 75 | 180 |
| 温硫酸カリウム 0.0168M ; | — | 25 | 120 |
| テトラメチルエチレンジアミン, 0.039M | S1 (UVフィルター付) | 25 | 300 |
| テトラメチルエチレンジアミン, 0.039M | — | — | — |
| リボフラビン, 0.00047M | — | — | — |

* 使用した光源のリスト

S1 水銀ランプ, LEITZ WETSLER Type 307-148.002, 100W
 S2 Black Ray 長波長UVランプ, モデルB-100A W/FLOOD
 S3 MELLES GRIOT He-Ne レーザー, 10mW 出力, λ=632 nm
 S4 American Laser Corporation, アルゴンイオンレーザー,
 モデル 909B P-15-01001 ; 入=488
 非常に多くの他の染料も、光重合に用いられ得る。これららの染料は以下を含むが、これらに限定されない: エリスロシン、フロキシン(phloxine)、ローズベンガル、チオネイン、カンファーキノン、エチルエオシン、エオシン、メチレンブルー、およびリボフラビン。使用し得る多くの共触媒は、以下を含むが、これらに限定されない:N-メチルジエタノールアミン、N,N'-ジメチルベンジルアミン、トリエタノールアミン、トリエチルアミン、ジベンジルアミン、N-ベンジルエタノールアミン、N-イソプロピルベンジルアミン、およびN-ビニルピロリジノン。

実施例6:N-イソプロピルアクリルアミドから得られる感熱性の生分解性ゲル

低分子量ポリイソプロピルアクリルアミドの合成

N-イソプロピルアクリルアミド(NIPAAm)を、65:35ヘキサンベンゼン混合液から再結晶した。アゾビスイソブチロニトリル(AIBN)を、メタノールから再結晶した。1:1アセトン水混合液中で、3mgのAIBNおよび150mgのメルカプトエタノールを用いて1.5gのNIPAAmを重合した(65°Cで24時間)。重合後、粘調な液体を、アセトンに溶解し、ジエチルエーテル中で沈殿させて精製した。収率は80%。

このヒドロキシ末端を有する低分子量ポリ(NIPAAm)を、グリコリドを用いて鎖伸長反応に、続いて他の実施例に記載の通り、アクリロイルクロライドを用いてエン

改変ポリ(NIPAAm)ベースのオリゴマー1gおよび1KL 0.2gを、0°Cで水の溶かし、そして2-2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン(900ppm)を用いて0°Cで重合した。

実施例7:インピトロでの分解

ゲルを実施例1に記載のようにして抽出して、重合しなかったマクロマーフラクションを除き、次いで、37°C、pH7.4の50mM HEPESで緩衝化された塩溶液(0.9%NaCl)中にゲルを置いた。2重のサンプルを定期的に取り出し、これを新鮮なHBSで洗浄し、100°Cで1日間乾燥し、そして重量を測定してゲルの重量損失を決定した。使用した種々のゲルの組成は、先の実施例で記載したのと同じであった。表9にこれらのゲルの分解程度を、時間あたりの重量損失パーセントとして示す。各時間と、重量損失データと共に括弧中に示す。

表9:ゲルの分解

1KG 20.1% (1日), 20.36±0.6 (2日), 21.7±(6日),

28.8±16.6 (10日) 算出全分解時間は45日。

4KG 38.9 (1日), 60.3±4.2 (2日), 78.9 (3日),

99.3±4.7 (6日) 算出全分解時間は5.5日。

6KG 18.3±6.8 (1日), 27.4±1.0 (2日), 32.8±11.3 (3日), 104.8±3.2 (5日) 算出全分解時間は4.5

目

10KG 0.6 ± 0.8 (8時間), 100 (1日) 全分解時間は1日。

10KL 10.0 ± 4.84 (2日), 6.8 ± 1.7 (3日), 4.5 ± 3.1 (6日), 8.0 ± 0.2 (10日) 算出全分解時間は20日.
20KG 68.1 ± 4.2 (8時間), 99.7 ± 0.3 (1日) 算出全分解時間は15時間。

実施例8:線維芽細胞の付着および広がり

ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) 細胞の光重合ゲルに対するインビトロでの応答を、ポリマー網目構造上での細胞培養により評価した。0.2mlのモノマー溶液を、無菌条件下で18X18mmのカバーガラス上でUV重合した。HFF細胞をこれらのゲル上で、10%牛胎児血清を補ったダルベッコの改変イーグル培地 (DMEM) 中、 1.8×10^4 細胞/カバーガラスの平方cmの細胞密度で植え付けた。37°C、5% CO₂環境下で、6時間ゲルをインキュベートし、その後にリン酸緩衝塩溶液 (PBS) で2回洗浄した。PBS中で付着細胞を、2%グルタルアルデヒド溶液を用いて固定した。このゲルを、位相差顕微鏡を用いて200Xの倍率で検査し、そしてカバーガラス上の予め決められた場所の選択された5領域を検査して、付着および展開細胞数を求めた。

付着細胞数を、ガラスコントロール表面に対する付着細胞数と共に表10に示す。細胞付着は、ゲルをコートしたガラス上では、劇的に低下することがみられた。

表10:細胞付着

| 表面 | 付着細胞/cm ² |
|---------|----------------------|
| ガラス | 13220 ± 3730 |
| 18.5KG | 250 ± 240 |
| 18.5KCL | 1170 ± 1020 |
| 18.5KCO | 390 ± 150 |

18.5KCLゲル表面上およびコントロールガラス表面上のこれらの細胞の代表的な写真を、図2Aおよび2Bに示す。表10から容易に、これらのゲルが高度に細胞増殖に対して耐性であることが判り得る。18.5KCLでさえ、表中のガラスの10%に満たない。ガラス表面に付着した細胞は、平坦でよく広がった形態を示すが、ゲルに付着した僅かの細胞は、丸まつて付着も緩い。これは、水和PEG鎖が高い運動力を有し、そしてタンパク質の吸着を最小にすることに効果があることが示されたという事実に起因し得る。細胞付着が媒介されるメカニズムの1つは、細胞表面のレセプターと吸着細胞の付着タンパク質との相互作用であると考えられる。したがって、全体のタンパク質吸着を減少させると、細胞付着タンパク質の吸着が最小になり、そして細胞付着が減少する。

実施例9:ポリマーからのタンパク質 (ウシ血清アルブミン) の放出

1KGをこの研究に用いた。このマクロマーは、室温では液体であり、そのまま用いた。開始剤としての2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン0.9mg/mlと共に

に、ウシ血清アルブミン (BSA) をモノマー溶液1mlあたり1mg加えた。このタンパク質をモノマー溶液に溶解し、そしてマクロマー混合液0.2gをLWUVに1分間さらしてディスク状のゲルを作製した。このようなディスク2個を、PBS20mlを有するフラスコに入れ、そして37°Cでインキュベートした。定期的にこれらのフラスコから各20μlの分別量を取り出し、そして放出されたBSAの量を、Bio-Radトータルプロテインアッセイを用いて検定した。BSAについての放出プロファイルを、図3Aに示す。BSAの放出は1ヵ月間以上にわたって比較的安定していることが認められる。

実施例10:酵素放出アッセイ

水溶性のマクロマーを用いたゲル化は、非毒性環境下で行い得る。このことは、これらの材料をインサイチュでのゲル化を必要とする内的手術用途に適合させる。前駆体は水溶性なので、ゲルは、水溶性薬物、特に別の方法では変性して活性を失う酵素のような巨大分子の薬物送達ベヒクルとして用いられ得る。ポリマーからのリゾームおよびtPAの放出を用いて、生体高分子の放出を制御するために生分解性親水ゲルを用い得ることを示した。

リゾームの放出

酵素リゾーム (MW:14,400) は、生分解性ゲルからの低分子量タンパク質の放出について都合の良いモデルである。上記Bioradトータルプロテインアッセイを用いて、放出された酵素を定量した。酵素はPBSに20mg/mlの濃度で溶解した。モノマーであるPEG-dl-乳酸-ジアクリレートをPBSに溶解して、40%溶液にした。このリゾーム溶液をモノマー溶液に加え、24%モノマー溶液を得た。このモノマー/リゾーム溶液を、円柱の注型中で、30μlの2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンの1-ビニル-2-ピロリド (30mg/ml) 溶液を開始剤としてUV下で重合した。ポリマーを10個の等サイズの断片に切り分けて、10mlのPBSに浸した。PBSのサンプルをある間隔で取り出し、リゾームのPBS中への放出について検定した。リゾームは、PEG-dl-乳酸-ジアクリレートゲルから8日間にわたって放出され、図3Bに示すように最初の2時間内の最大の放出速度を示した。

組換えt-PAの放出

3つのマクロマーをこれらの研究に用いた: 1KL、4KG、および18.5KG。1KLマクロマーは室温で液体であり、そのまま用いた。第2のマクロマー、4KG、はPBS中75%w/w溶液として用いた。第3の組成物は、1KLと18.5KGの50%w/w溶液とが等しい割合の混合物である。開始剤としての2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン0.9mg/mlと共に、マクロマー溶液1gあたり3.37mg組織プラスミノーゲンアクティベーター (一本鎖、組換え体、M.W. 71,000) をマクロマー溶液に加えた。タンパク質をマクロマーで溶解し、そしてマクロマー混合液0.2gをLWUV

に1分間さらしてディスク状のゲルを作製した。このようなディスク2個をPBSで洗浄し、PBS5mlを有するフラスコに入れ、そして37°Cでインキュベートした。定期的にこれらのフラスコから各100 μ lの分別量を取り出し、そして放出された活性t-PAの量を、発色基質アッセイ(Kabi-vitrum)を用いて検定した。1Kラクチドゲル、4Kグリコリドゲル、および50/501Kグリコリド/18.5Kグリコリドからの放出プロファイルを図4A~4Cに示す。全ての活性t-PAは、少なくとも2カ月間まで放出され得る。

適切な処方を選択することで、放出速度を個々の適用に応じて調整し得る。また、放出および機械的特性上の適切な特質な共働的に達成するように、処方を異なる分子量と組み合わせ得る。

手術後の付着を防ぐために、ゲルのバリア効果に加えて、バリア効果をすり抜ける初期薄膜状付着を溶解させる線維素溶解剤と共にゲルを導入し得る。このことは、付着防止において生分解性ゲルの有効性をさらに増進する。

実施例11:ポリマーおよび市販の接着剤の毒性

本明細書に記載のマクロマー四液のインサイチュ重合の毒性を、市販の接着剤と比較して評価するため、100 μ lの18.5KC0プレポリマー溶液を、ラット肝臓右葉上に置き、そしてLWUVに15秒さらしてゲル化した；同様に、n-ブチルシアノアクリレートをベースとする接着剤の数滴を左葉上に置いた。上記肝臓を1週間後に切除し、10%中性緩衝化ホルマリン中で固定し、パラフィンでブロックし、薄切片にし、そしてヘマトキシリントロピエオシンを用いて染色した。

生分解性ゲルにさらされた上記葉の表面には、不都合な組織反応を示す証拠はなかった。重合プロセスに対する炎症反応も認められない。上皮は、拒絶反応はなく、正常にみえる。

これに比べて、シアノアクリレート接着剤にさらされた葉は、過度の組織壊死および10~30細胞深度(cell depth)に及び重度の壊死組織を示す。正常組織に近い壊死部分においては線維組織の増殖が明らかである。

実施例12:光重合生分解性ポリマーを用いた手術後付着の防止

短いポリグリコリド反復単位(平均グリコリジル残基数:各端で10)で両端が鎖伸長され、次いでアクリレート基で終結されたポリエチレングリコール(M.W. 18,500)の、粘稠な無菌の23%溶液(リン酸緩衝生理食塩水中(8.0g/1 NaCl, 0.201g/1 KCl, 0.611g/1 Na₂HPO₄, 0.191g/1 KH₂PO₄, pH7.4))を調製した。架橋反応に必要な開始剤、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを、マクロマー溶液に加えて、開始剤濃度を900ppmにした。長波長のUVランプ(Blak Ray)に30秒曝すことによって効果的に重合が開始する。

評価した動物モデル

評価した動物モデルは、ラットの盲腸モデルおよびウサギ子宫角モデルを含む。ラット盲腸モードにおいては、マクロマー溶液で処置された7匹の動物のうち、6匹は付着を示さなかつたが、未処置の動物は、一致して密な付着形成を示した。ウサギ子宫角モデルでは、付着形成において有意な($p < 0.01$)減少がゲルで処置された動物でみられた。ゲル化しない粘稠な前駆体溶液(LW UVなし)のみを用いたラットによる研究では、付着の形成を防止できなかつた。

ラット盲腸モデル

21匹の平均体重250gのSprague Dawley雌ラットを3群に分けて、1群は処置用、2群はコントロール用とした。腹部の毛を剃り、ベタジン溶液を用いて準備した。Equithesin麻酔下で中央を切開した。盲腸を露出させ、盲腸の片側に約2×1cmの領域上に4から5個の擦り傷を付け、4×4インチのガーゼパッドを用いて漿膜傷および斑点状出血をつくった。これらの動物の腹部の切開部分を、筋肉層について連続した4-0絹縫糸、上皮層については7.5mmのステンレス鋼ステープルを用いて閉じた。抗生物質を局所的に切開部分に適用した。

第1の群は、モデルの有効性を確認するために、処理をしていないコントロールとして7匹の動物から構成された。第2の群は、親水ゲル形成のための光重合をしていない前駆体を塗布したコントロールとした。盲腸に傷をつけた後、約0.25mlの前駆体溶液を、ピペットを用いて傷部分に塗布した。次いで腹部の切開部分を上記のようにして閉じた。

第3の群は、ゲル処置群とし、前駆体フィルムを45秒間LWUVランプに曝してゲル化したこと以外は第2の群とした。盲腸の表面側および裏側の両方とも、前駆体および光で同様に処置した。組織表面を乾かすこと、血液を除くこと、あるいは処置前に領域を洗浄することはしなかつた。

2週間目の終わりに、動物をCO₂を吸引させて屠殺した。切開部分を再び開き、付着を位置、程度、および粘着度についてスコアした。付着の程度を、近くの器官または腹膜壁と付着を形成している盲腸の障害領域のペーントとして報告した。付着の粘着度を、0から4のスケールに基づいてスコアした：接着なし-等級0；しばしばそれ自身分離する一時的な透明の付着-等級1；幾分抵抗するが手ではがれる付着-等級2；分離するために鈍器による切開が必要な付着-等級3；および、分離するのに付着面において鋭い器具による切開が必要な付着-等級4。

ラット盲腸モデルの結果

未処理のコントロール群は、一貫して密で広範囲な付着を示す。付着で覆われた擦傷領域の程度は、73±21%(平均値±S.D.、n=7)まで見られた。付着の重症度は、等級3.5±0.4であった。大部分の付着は、密で纖維状であり、盲腸と盲腸自身との付着、盲腸と腹膜壁との

付着、および盲腸と肝臓、小腸および大腸などの他の器官との付着が見られた。しばしば、腸間膜 (mesentery) が付着で覆われていることが見られた。前駆体溶液で処理し、LWUVランプに曝すことによりゲル化していないコントロール群では、付着の程度は、 $60 \pm 24\%$ ($n = 7$) であり、そして付着の重症度は、等級 3.1 ± 0.4 であった。ゲル処理群では、7匹の動物のうち6匹において、盲腸は全く付着していなかった。ある場合には、等級2の付着が、腸間膜の10%を越える領域に見られ、そして等級2.5の付着は、腸間膜の15%を越える領域に見られ、それらは盲腸から腹膜壁の切開部位上の縫合部まで及んだ。この群の全体の付着の程度は4%であり、そして全体の重症度は0.32であった。残留ゲルの形跡は肉眼では見えなかつたが、おそらくゲルはそれ以前2週間以内に分解したのだろう。コントロール群において、盲腸は表面上に線維状の層を有して白っぽく見えたが、組織は、ゲルで処理された動物においては健常で正常に見えた。

ウサギ子宮角モデル

2kgおよび3kgの間の体重を有する、8匹の性的に成熟した雌のニュージーランドウサギを手術用いた。ロムパン (Rompun)、ケタミン (Ketamine) およびアセプロマジン (Acpromazine) で麻酔して、下腹部領域の中央線を切開した。子宮角の場所を見つけ出し、そして両方の角に対する血管系を体系的に焼灼して虚血性損傷を引き起こした。1匹の動物は、未成熟の子宮角により研究から除かれた。光重合性親水ゲルのみで処理するため、7匹のウサギを選び、そしてフィブリン溶解因子、すなわち組織性プラスミノーゲンアクティベータ (t-PA) を用いての親水ゲルの複合的効力を評価するために、2匹の動物を選んだ。後者の場合には、マクロマー溶液1ml当たり5mgのtPAを用いた。焼灼 (cauterization) した後、マクロマー溶液 (0.5ml) を角に沿って塗り、そして焼灼による損傷が引き起こされた表面を被覆した。その溶液を均一に完全に塗布した後、角をLWUVランプに1分間曝してゲル化を誘導した。この手順を角の反対側で繰り返した。次いで、切開部を、筋腹膜層に対しては2-0Vicryl (Ethicon) 連続縫合糸を用いて閉じ、皮膚層に対しては0Vicryl (Ethicon) 縫合糸を用いて閉じた。予防的な抗生素は投与されなかつた。術後の合併症または感染症は認められなかつた。コントロール群には5匹の動物を用いた。上記の虚血性損傷を作り、切開部を前駆体を塗らずに閉じた；すべての手術は、治療群とコントロール群との間では同じであった。

マクロマーを塗らずに手術を行った同じ動物モデルをコントロールとして用いた；すべての手術技術は、治療群と病歴コントロールとの間で同じであった。

2週の終わりにウサギをケタミン麻酔して再手術し、付着形成を評価した；心臓内にKClを注入することによりウサギを屠殺した。付着形成をその度および粘着性に

対して評価した。子宮角自身、あるいは、腹膜壁または他の器官と付着を形成した子宮角の長さを測定することにより、付着形成の程度を評価した。付着の粘着性をフィルム状または線維状のいずれかに分類した。フィルム状の付着は、通常、透明であり、あまり強くなく、そして手で剥がれ得た。線維状の付着は、密であり、白っぽく、そして通常、剥がすためには鋭い器具による切開を必要とした。単一のフィルム状の付着バンドのみが明瞭である場合には、5%のスコアを割り当てる。

角の典型的な試料を組織学的に切除し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中に固定した。試料のパラフィン部分をヘマトキシリソおよびエオシンを用いて染色した。

ウサギ子宮角モデルの結果

付着スコアは、フィルム状または線維状の各々に等級化される、付着部により占められる疾患領域%である。コントロール動物では、曲がった角の解剖構造が認められた。コントロール群の平均スコアは、角の疾患領域のうち付着部により占められる $50 \pm 15\%$ であり、その付着部はそのうち10%がフィルム状で90%が線維状であった。コントロールとして用いられた動物内の子宮角の上部を表す図5Aのように、曲がった角の解剖構造が認められ、角の表面の66%を越えて付着を示した。光重合化マクロマーのみで処理した動物群は、 $13 \pm 11.4\%$ ($n = 10$) の付着スコアを示した。これらのうち4匹の動物は、時々肉眼で見えるフィルム状バンドのみを有し5%未満の付着を示した。

tPAを含有する光重合化ゲルで処置した動物は、「ゲルのみ」の動物に比べてさらに改善された結果を示した。1匹の動物は、左右の両方の角上にフィルム状のバンドを示した。それは各5%、総スコア10%として割り当てる。他の動物は付着を全く示さなかつた。このように、これらの動物に対する総スコアは、 $5 \pm 5\%$ であった。

図5Bは、ゲル処理を受けた代表的な角における正常な角の解剖構造を示す。付着は、すべての場合ではフィルム状であり、密なバンドは見られない。残留ゲルの痕跡が認められなかつた。フィルム状の付着を示す角の代表的試料は、6～15個の細胞の厚さのある種のコラーゲン原線維を示すが密なコラーゲン線維の形成は示さない線維芽細胞層を有するある種の線維状組織を示した。付着を示さない角は、時折1～4個の細胞の厚さの線維芽細胞層を示したが、大抵は、炎症性細胞のない正常な上皮であった。

ラット子宮角モデルを用いて術後の付着を予防するため、ポリマーを用いるより良好な形態として、下記のようにこの同じ手順をわずかに改変した。

ペントバルビタール (50mg/kg、腹腔内) により雌のラットを麻酔し、そして中央線開腹手術を行つた。子宮角を曝し、そして角に栄養を供給する弧 (arcade) 内の血管系を両極性焼灼器を用いて系統的に焼灼した；各々

の角の上の最近位および最遠位の大血管は焼灼しなかつた。これに続いて、各々の角の対腸間膜の表面を、各々角上の2つの1mm直径のスポットで焼灼した。各々は、2cm間隔で分離され、対は、各角の長さに沿って中心に置かれた。損傷後、マクロマー溶液0.5mlを各角に対して塗り、各々前側および後側の表面に対して15秒間、長波長の紫外線(365nm、約20mW/cm²)を露光することによってゲル化した。子宮を腹膜腔内のものとの場所に置き、そして筋腹膜層および皮膚層を閉じた。

分子量8,000ダルトンのPEG鎖から成るマクロマーは、その両側に5個のラクチジル基の平均重合度の乳酸オリゴマーを有して伸長し、そしてさらに、アクリロイルクロライドとの反応により両末端をアクリレート化した。1つのバッチ、すなわちバッチAでは、アクリレート化度は、NMRにより測定して約75%であり、そしてもう別のバッチ、すなわちバッチBでは、アクリレート化度は、約95%以上であった。マクロマーを特定の濃度で生理食塩水に溶かし、そして用いた反応開始剤は、N-ビニルピロリジノン中のストック溶液からの2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンであった。2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンの最終濃度は90

0ppmであり、そしてN-ビニルピロリジノンの最終濃度は0.15%であった。

1組の実験において、バッチAからのマクロマーを様々な濃度で塗布し、そして手術後7日目に付着をスコア化した。スコア化は2つの手段により行った。付着部に包まれた角の長さを定規で測定し、そして全長に対するこの小部分を計算した。付着部の性質もまた主観的なスケールでスコア化した。すなわち、0は付着なしであり、1は手で容易に分離されるフィルム状の付着であり、そして2は鋭い器具による切開によりのみ分離され得る密な付着である。さらに、試料のうち1つは、付着を軽減することが知られている組織由来プラスミノーゲンアクティベータ(t-PA)を、0.5mg/ml(0.5%)の濃度でマクロマー溶液に含有していた。マクロマーのバッチAおよびバッチBに対して、結果を表11に示す。

3番目の組の実験において、上記のように雌のラット内に付着部を形成させ、そして最初の手術後7日目に付着部を外科的に溶解した。溶解の間、付着の程度および等級をスコア化した。動物を2つの群に分け、そして、1つの群をバッチBからの10%濃度のマクロマーで処理した。バッチB、10%として、結果を表11に示す。

表11：ポリマーを用いる付着の減少

| マクロマー濃度 | 付着の程度 % (S, D.) | 付着の等級 (0-2) | 動物の数 |
|--------------------|--------------------|----------------|----------|
| <u>ポリマー A</u> | | | |
| 15% | 24.6(3.1) | 1.1(0.1) | 7 |
| 20% | 33.6(9.8) | 1.2(0.3) | 7 |
| 25% | 37.5(11.1) | 1.2(0.1) | 7 |
| 30% | 54.2(12.0) | 1.6(0.4) | 6 |
| 20% + t-PA | 18.3(6.4) | 1.1(0.1) | 6 |
| コントロール(生理食塩水) | 72.6(18.7) | 1.5(0.2) | 7 |
| <u>ポリマー B</u> | | | |
| 5% | 22.1(4.2) | 1.2(0.1) | 7 |
| 10% | 10.0(5.1) | 1.0(0) | 7 |
| 15% | 17.8(5.7) | 1.0(0) | 7 |
| 20% | 26.3(11.4) | 1.4(0.2) | 7 |
| コントロール(生理食塩水) | 75.9(4.4) | 1.8(0.3) | 7 |
| <u>ポリマー B, 10%</u> | | | |
| スコア化を行った時： | | | |
| 溶解時 | コントロール群 | 85.9(9.7) | 1.8(0.1) |
| 溶解時 | 処理群 | 79.4(6.8) | 1.7(0.2) |
| 7日目(溶解後) | コントロール群 | 78.8(11.3) | 1.8(0.1) |
| 7日目(溶解後) | 処理群 | 28.2(5.1) | 1.0(0) |

上記の結果は、光重合化マクロマーが、手術後の付着を1次付着と付着溶解(adhesiolysis)モデルとの両方で減少または予防し得ることを示し、さらにゲルが、薬剤を局所的に放出し、組み合わさった有効作用を奏する

のに用いられ得ることを示す。

実施例13: 神経吻合

ラットの坐骨神経を、メスを用いて無菌状態で切断し、そして引き離した。神経の2つの末端を滅菌鉗子を

用いて再び対向させ、そしてポリマー1KL（ラクチド鎖伸長部分およびアクリレート終末端を有するPEG1Kから製造されたマクロマー）の緩衝液中の50%溶液を、0.1%の2,2-ジメトキシ-2-フェノキシアセトフェノンと共にその神経断端に塗布した。疾患領域を、100W LWU Vランプで60秒間照射し、そして付着結合が、近位の神経断端と遠位の神経断端との間に形成することを観察した。

塗布された材料の神経組織との生体適合性を確かめるために、マクロマーの同一溶液を、切断していないラットの坐骨神経に塗布し、そして切開領域を標準の小動物手術を用いて閉じた。その領域を手術後、1時間または24時間で再び切開し、そして神経の疾患領域を、ブロックに移し、透過型電子顕微鏡用に調製した。たとえ、処置された神経が、外傷を起こしそして操作されたことによるものであったとしても、操作されていないコントロールラットの坐骨神経と比較して、各時点で処置された神経間に形態的な差異は認められなかった。

実施例14:PEGをベースとした分解性ゲルの組織接着剤としての評価

雌のニュージーランド白色ウサギの腹筋弁を切開し、1cm×5cmの小片にカットした。その弁は、およそ0.5cm～0.8cmの厚さであった。2つのそのような小片を用いて1cm×1cmの重なり接合部（lap joint）を作った。2つの異なる組成物（0.6KLおよび1KL）をこれらの組織上で評価した。これらの組成物の両方は、粘性の液体であり、さらに希釈することなく用いた。N-ビニルピロリドン（20mg/ml）中の $125\mu\text{l}$ のエチルエオシン溶液を、 $50\mu\text{l}$ のトリエタノールアミンと共に各々のmlの付着溶液に添加した。 $100\mu\text{l}$ の付着溶液を重ね合わせた各々の弁に塗布した。次いで、重なり接合部を2Wのアルゴンイオンレーザーで30秒間、各側面からスキャンすることにより照射した。得られた接合体の強度を、重なり接合部を剪断するのに必要な力を測定することによって評価した。重なり接合部の一端をクランプで留め、そして他端に増加する荷重をかけ、接合部を保持する間クランプで留め、接合部を水平に保持しながら増加する荷重をそれが壊れるまで他端にかけた。4つの接合部を各々の組成物で処理した。1KLの接合部は、 $6.6 \pm 1.0\text{ kPa}$ （平均±S.D.）の強度を有し、0.6KLの接合部は、 $11.4 \pm 2.9\text{ kPa}$ の強度を有した。6mm～8mmの組織の厚さにもかかわらず、光重合および適度な接合部強度を達成することが可能であったことを特に記しておく。514nmの光を用いる分光光度的評価では、そのような筋組織を介しては1%未満の伝達しか示さなかった。

実施例15:タンパク質（アルブミン）への光重合性基のカップリング

PEG（M.W. 2,000）モノアクリレート（5g）を、20mlのジクロロメタンに溶解させた。トリエチルアミン（0.523g）および2,2-トリフルオロエタンスルホニルクロ

ライド（トレシルクロライド）（0.017g）を添加し、そして反応を、窒素気流下で0°Cで3時間進行させた。次いで、反応混合物を濾過し、そしてジクロロメタンをエバボレートして乾燥した。残留物を少量のジクロロメタンで再溶解し、ジエチルエーテル中で沈殿させた。次いでポリマーを濾過し真空下で10時間乾燥させ、そして引き続くアルブミンとの反応で直接使用した。

1gのウシ血清アルブミンを、pH9の200mlの炭酸水素ナトリウム緩衝液に溶解させた。トレシル活性化PEGモノアクリレート（5g）を添加し、そして反応物を25°Cで24時間攪拌した。反応混合物をアセトンに注ぐことによりアルブミンを分離した。さらに、15,000ダルトンのカットオフ透析膜を用いる透析によって精製した。10%w/vのPEGアクリル化アルブミン溶液を、開始剤として0.9mg/mlの2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを用いて長波長のUV照射を用いて光重合し得た。このゲル中の分解性セグメントは、タンパク質アルブミンである。

実施例16:多糖の修飾（ヒアルロン酸）

乾燥した250mlの丸底フラスコ中で、10gのPEG400モノメタクリレートを100mlの乾燥ジオキサン中に溶解させた。これに、4.053gのカルボニルジイミダゾール（CDI I）を窒素雰囲気下でゆっくりと導入し、フラスコを6時間50°Cで加熱した。その後、溶媒を減圧下でエバボレートし、CDI活性化PEGモノマーを、ジクロロメタン中への溶解およびエーテル中での沈殿2回により精製した。

1gのヒアルロン酸、5gのCDI活性化PEG400モノアクリレートを200mlのホウ酸ナトリウム緩衝液（pH8.5）中に溶解し、この溶液を24時間攪拌した。これを次に、カットオフ値15,000ダルトンの透析膜を用いて透析し、未反応のPEGを除去した。アクリレート化ヒアルロン酸の10%w/v溶液を長波長UV照射で、0.9mg/mlの2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを開始剤として用いて、光重合させた。このゲル中では、分解性の部分はヒアルロン酸である。

実施例17:ポリオルトカーボネートで伸長されウレタンメタクリレートでキャップされたPEG鎖

3,9-ビス（メチレン）2,4,8,10-テトラオキサスピロ[5.5]ウンデカン（1g）およびポリエチレングリコール（分子量1,000、7.059g）を、グローブバッグ中の乾燥窒素雰囲気下で、秤量して250mlのシュレンク（Schlenk）管に入れた。50mlの乾燥テトラヒドロフランを窒素雰囲気下で導入し、反応混合物を50%で6時間攪拌した。これは、乱された化学量論量（disturbed stoichiometry）を用いる、代表的な段階成長反応（step growth reaction）であり、結果として、末端ヒドロキシ基を有する低分子量ポリオルトカーボネートを生じる。このオリゴマーは、ヘキサン中での沈殿により分離し、真空下で乾燥した。5gのオリゴマーを乾燥THF中に再溶解させ、これに、 $20\mu\text{l}$ のジブチル錫ジラウレートをおよび2mlの2-イソシアナートエチルメタクリレートをゆっく

りと導入し、温度を50°Cまで上昇させた。この温度で6時間保持し、冷却した。生成物をヘキサン中での沈殿により分離した。このゲル中では、分解性の部分はポリオルトカーボネートである。

実施例18:動物細胞のミクロカプセル化

HEPES緩衝生理食塩水中の18.5KGの23%w/w溶液(5mL)を用いて、10°CEM-SS細胞を再懸濁させた。エチルエオシン(10^{-1} M)を、N-ビニルピロリドン中の溶液として、開始剤として用い、トリエタノールアミン(0.01M)を共開始剤として用いた。この溶液を次に、共押し出し器を通じて、アルゴンイオンレーザー(514nm、2ワット)に曝した。この共押し出し器は、前駆体細胞懸濁液の押し出し流(流速0.5ml/min)の周囲を環状に流れる液体(流速4ml/min)として、鉛物油を有した。微小液滴は、レーザ光に曝されると急速にゲル化し、PBSを含む容器に採取された。油は水相から分離し、微小球を下層のPBSに採取できた。形成された微小球はPBS緩衝液で充分に洗浄し、未反応のモノマーおよび残留する開始剤を除去した。微小球の大きさおよび形は、押し出し速度および押し出しキャビラリーの直径(18Gaより25Ga)に依存した。重合時間は、開始剤濃度(エチルエオシン5μMから0.5mM、ビニルピロリドン(0.001%から0.1%)およびトリエタノールアミン(5mMから0.1M)、レーザ出力(120mWから2W)、およびモノマー濃度(>10%w/v)に依存した。この方法により調製された球は、500μmから1,200μmの直径を有した。重合は、空気の存在下、生理的pHで行われた。ラジカル重合は酸素の存在に

より影響され得るので、このことは重要である。カプセル化後の細胞の生存度は、トリパンブルー排除アッセイによりチェックされ、カプセル化された細胞はカプセル化の後95%以上生存していることが見いだされた。

実施例19:手術後付着の予防のための種々の処方

PEG-オリゴ(α -ヒドロキシ酸)ジアクリレートおよびテトラアクリレートの手術後付着の予防のための有用性を、ウサギ子宮角モデルにおいて、上記のようにして評価した。以下のポリマーを、上記のようにして合成した:PEG6Kラクチドジアクリレート(6KL)、PEG10Kラクチドジアクリレート(10KL)、PEG18.5Kラクチド(18.5KL)、PEG20Kラクチド(20KL)。PBS中24%ポリマーを有し、900ppmの2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを有する溶液を、上記のようにして調製した。この溶液を、血管弧の焼灼の後に子宮角に塗布し、上記のようにして、365nmLWUVランプで照射した。1つの処方、18.5KLにおいては、5mgのt-PAを塗布の前に溶液に混合した。操作され焼灼されたがマクロマー溶液で処置されていない動物をコントロールとした。測定は14±1日目におこなった。付着の程度は、付着に関与した角の小部分(fraction)から判断し、付着部分の粘着度を以下のように採点した:0、付着なし;1、切開に対して抵抗しないフィルム上の付着;2、手で切開し得る線維性の付着;3、先の丸い器具で切開し得る線維性の付着;4、鋭利な器具で切開し得る線維性の付着。結果は以下の通りであった。付着の程度、および付着部分の粘直度を示す。

表12: 付着の予防についてのポリマーの効果

| 処方 | 動物の数 | 程度、%、 ± S. D. | 粘着性、0-4、 ± S. D. |
|---------|------|------------------|---------------------|
| 6 KL | 7 | 0.9±1.7 | 0.9±0.7 |
| 10 KL | 7 | 0±0 | 0±0 |
| 20 KL | 6 | 4.4±5.0 | 0.9±0.7 |
| 18.5 KL | 7 | 8.9±13.1 | 1.6±1.3 |
| t-PA | | | |

コントロール

実施例20:血管傷害後の血栓症を低減するための、血管表面上でのポリマーの超薄膜の重合

血管をラットから採取し、血液を洗い落とした。管の内皮を、木製の合釘を挿入し管を合釘上で回転させることにより、取り除いた。1つの管をコントロールとして

35±22 3.3±0.6

用い、さらに修飾することなく、下記のように血流に曝した。他の管の処置として、まず、生理食塩水で1mMのエオシンYに曝し、次に、HEPES緩衝生理食塩水中で洗浄し、次に、トリエタノールアミン(TEA)(100mM)およびN-ビニルピロリドン(VP)(0.15%)を含有す

る、PEG-MA、アクリレートでエンドキャップされたDLラクチドのオリゴマーを有するPEG10K、の溶液で見たし、そして次に、 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ で15秒間アルゴンイオンレーザに曝すことにより照射した。管の内腔の、重合していないプレポリマー混合物は、生理食塩水で洗い流した。ヒト血液は、肘前静脈から採取し、ヘパリン2ユニット/ mL で抗凝固化した。この血液は、各々の管を通じ、シリソングポンプを用いて、約 $200/\text{s}$ の壁剪断率に相当する流速で、7分間灌流させた。管はその後、生理食塩水中で表面を洗浄し、ホルムアルデヒドで固定した。

処置された管には着色は見られず、また灌流前の色と比較して灌流後の色の違いは見られなかった。一方、未処置のコントロールの管は血赤色であった。各々の管の薄いセグメントを切り出し、末端に載せ、環境走査電子顕微鏡(ESEM)によって調らべた。ESEMは、比較的低真空中で水和したサンプルについて行う。このため、ポリマーフィルムのコーティングを、膨潤し湿った状態で可視化できる。このことは、容易に解釈し得る測定値を得るために重要である。なぜなら、このポリマーフィルムは約95%が水だからである。コントロールの管では、重度の血栓症が容易に観察された。この管の内腔は、図6Aに示すように、血栓の蓄積によって、灌流前の直径の3分の1未満まで狭くなっていた。これに対して、処置した管の内腔においては、図6Bに示すように、血栓は観察されなかった。管壁を高倍率にしても、付着した血栓は示されなかった。より高倍率では、白色構造が示される。これはポリマーフィルムであり、ESEMの電子ビームのもとでの異なるチャージにより、組織とはコントラストが異なる。このフィルムは、管の形状と正確に一致し、約 $5 - 8 \mu\text{m}$ の厚さであることが観察され得る。

重合された部分は、血管壁表面の近傍に限定された。光感応性の染料は管壁に吸着された。未結合の染料は洗い流された。内腔全体がプレポリマーで満たされたが、照射されたとき、ゲルの形成は、染料とプレポリマーとが接触する管壁に限定された。この界面重合工程は、 $7 \mu\text{m}$ 未満から $500 \mu\text{m}$ を越えるまでの種々の厚さの表面付着層を生成させるために行い得る。

上記の手法は、コントロールのラット動脈8つおよび処置した動脈8つについて行い、光学顕微鏡による等価な組織学的結果を上記のように得た。本研究によって示されたように、PEGプレポリマーは血管の内腔表面上で重合し得る。この修飾の直接の効果は、傷つけられた血管表面の血栓生成を低減させることである。これは、バルーン拡張により傷つけられた管および病巣の血栓生成を低減させることにより、バルーン血管形成術の結果を改善する上で明らかに有用である。この修飾の他の効果は、平滑筋細胞の過形成を低減することである。これは、2つの理由により期待される。第1に、血小板は、血管形成術後の過形成に関与すると考えられている潜在的な増殖因子、血小板由来増殖因子(PDGF)を含有す

る。PDGFの送達の遮断自体が、血小板によって送達されていたであろう「薬剤」の送達が妨げられるという点で、薬理学的な介入をもたらす。血栓症の結果としてトロンピンが生成するが、これは平滑筋細胞の分裂促進剤であることが知られている。トロンピンの生成、および管壁への送達の遮断もまた、薬理学的な介入をもたらす。さらに、平滑筋細胞の分裂促進剤であることが知られている、血漿に可溶性の他の増殖因子がある。ゲル層は、組織の表面上に透過選択的バリアーを与えることが知られており、従って、ゲル層は、血管形成術後の過形成を低減することが合理的に期待され得る。管壁上の血栓症の阻害はまた、いずれも血管への介入の後に時とて起こる、急性の再閉塞および血管痙攣の発生率を低減し得る。

実施例21: 血栓症を予防するための、血管内のマクロマーの界面重合

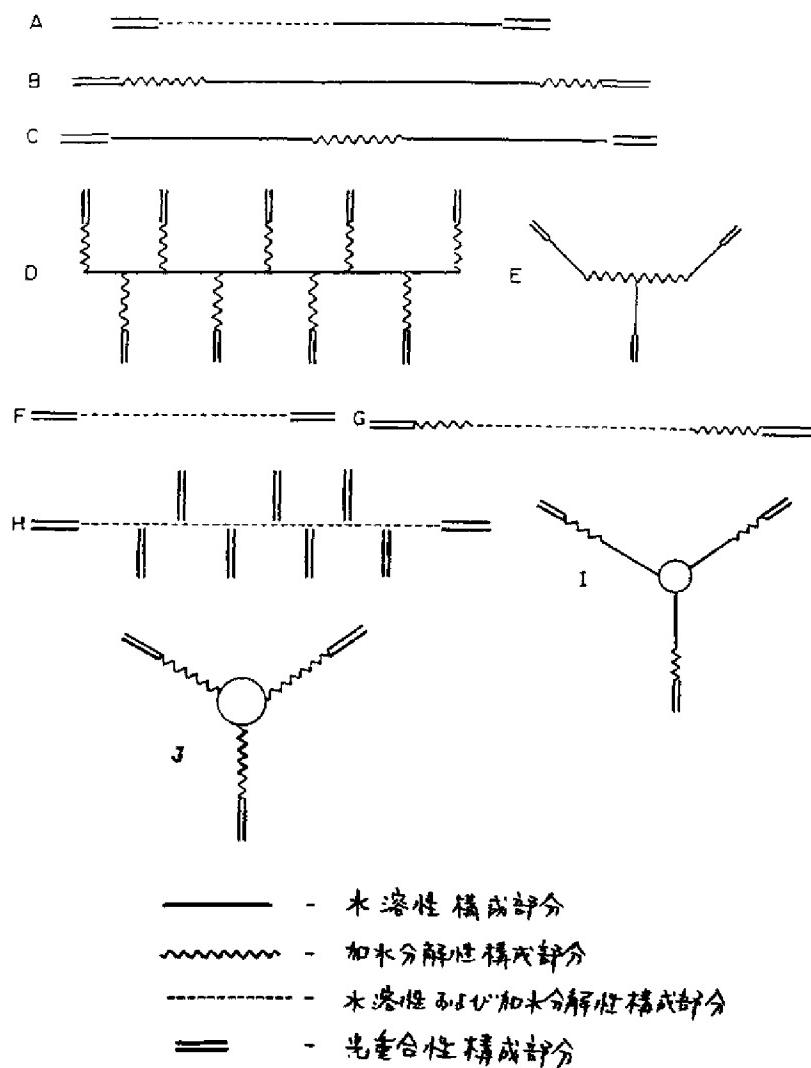
血栓症を予防するために、インビボで予め傷つけた血管内で、マクロマー溶液を界面重合させた。頸動脈を露出させ、ポリエチレンチューブ(PE-10)を用いて、外側の頸動脈にカニューレとして挿入した。動脈を、内側／外側の頸動脈の分岐に近くあって、この分岐から約2cm離れた位置で、細い動脈クランプで、はさんだ。1mlのツベルクリンシリジンを用いて、隔離されたゾーンの内腔から、この管のゾーンを満たしそして空にすることにより、血を洗い流した。この管を、血管鉗子を用いて圧搾することにより傷つけた。隔離されたゾーンにエオシンYの10mM溶液を2分間満たし、その後ゾーンを洗い、そして、0.1mMトリエタノールアミンおよび0.15%N-ビニルピロリジノンを含有する、マクロマーの20%生理食塩水溶液で満たした。このマクロマーは、MW8,000ダルトンのPEG鎖からなり、両側が、平均重合度が5ラクチジル基からなる乳酸オリゴマーで伸長され、さらに、アクリロイルクロライドとの反応により、両端が名目上アクリル化されていた。この管を、アルゴンイオンレーザ(514nm)を用いて、約 $1\text{mW}/\text{cm}^2$ の強度で5秒間、経壁的に照射した。この後、カニューレを外側の頸動脈から取り除き、動脈を分岐において結紮した。動脈クランプを取り除いて、血流を再開させた。20分間灌流させた後、管を再び隔離し、身体から取り外し、穏やかに洗い、固定し、光学顕微鏡による組織学的分析のために調製した。裸眼によると、照射されなかったコントロールの動物の圧搾したセグメントは赤くなり、捕獲された赤血球を有する内部の血栓を示した。これに対して、処置された血管の挫傷部位を赤くなっていたなかった。組織学的観察によれば、未処置の管においては、著しい血栓、フィブリン、および捕獲された赤血球が示された。これに対して、処置された管においては、血栓、フィブリン、または捕獲された赤血球のいずれも観察されなかつた。この手法は、コントロール動物4個体、および処置動物3個体について行われた。

本実施例は、生きている動物中でインサイチュで重合を行ひ得ること、ポリマーのコーティングが動物の血流によっても管壁への付着性を保つこと、および、ポリマーのコーティングが抗凝固化されていない動物においてインビボで血栓症を予防し得ることを示す。この処置のためのアプローチは、管内への介入をもたらす手法の後の、突然の再閉塞、血管痙攣、および再狭窄を予防する上で明らかな利点を有する。さらに、処置されるべき他

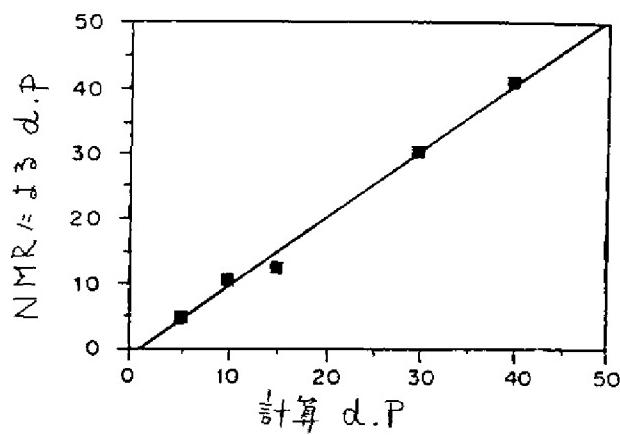
の内腔内および表面が露出した器官にも、より一般的に適用し得る。

マクロマーおよびポリマー性組成物およびそれらの使用方法を含む本願発明の修飾および変更は、上述の詳細な説明から、当業者には明らかである。そのような修飾および変更は、請求の範囲に記載の発明の範囲内にあることが意図される。

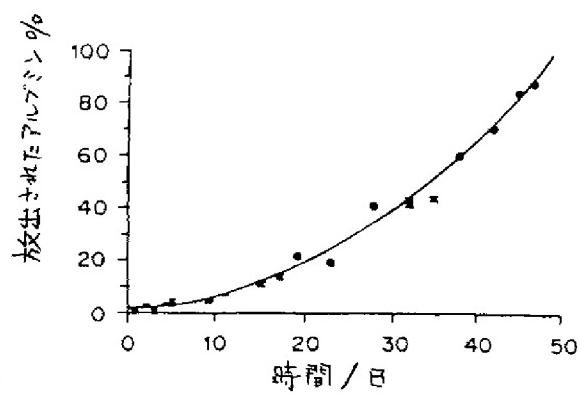
【第1図】



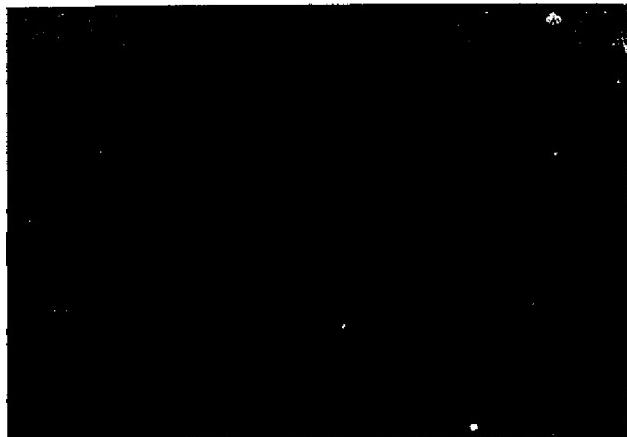
【第1 a図】



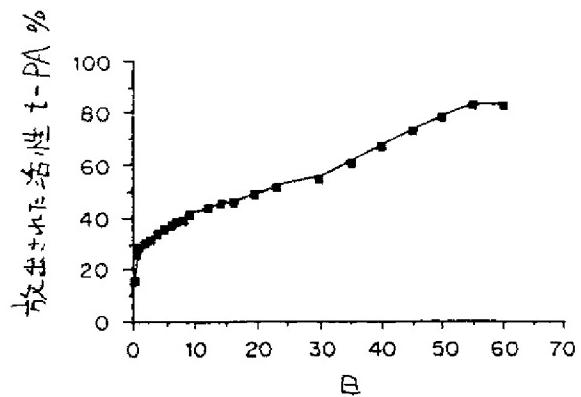
【第3 a図】



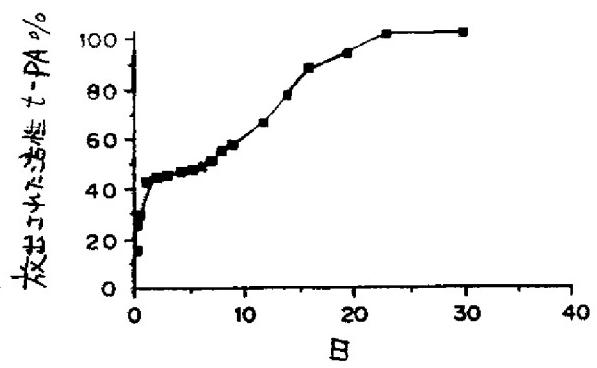
【第2 a図】



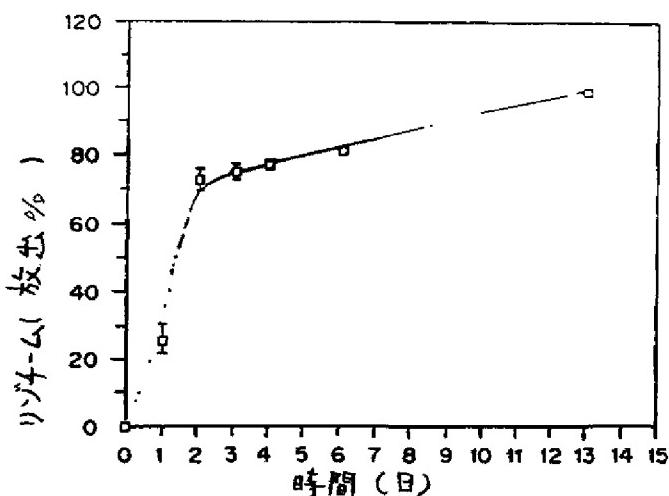
【第4 a図】



【第2 b図】

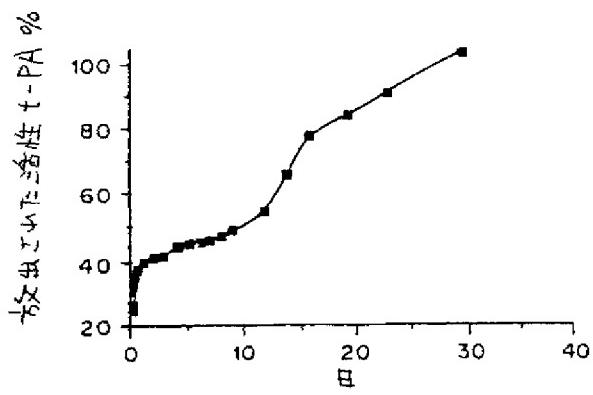
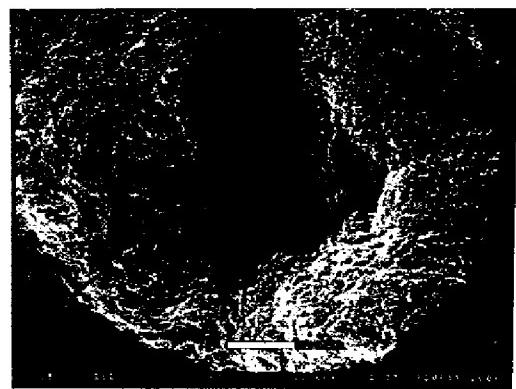


【第3 b図】



【第4 c図】

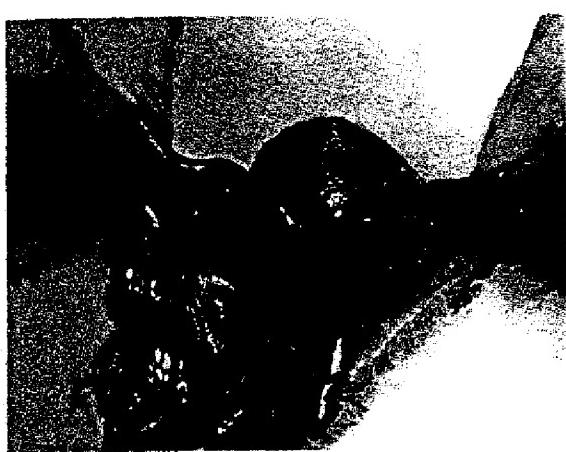
【第6 a図】



【第5 b図】

【第5 a図】

【第6 b図】



フロントページの続き

(72) 発明者 サーニー, アマルプリート エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02158, ニュートン, チャーチ ストリ
ート 148

(72) 発明者 デサイ, ニール ピー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア
90036, ロサンゼルス, アランデール
アベニュー 847

(72) 発明者 ヒル, ジェニファー, エル.
アメリカ合衆国 テキサス 78741, オ
ースティン, ナンバー821, ウィッカ
ズハム レーン 2501

(58) 調査した分野(Int.CI.⁷, DB名)
A61K 9/00
A61K 47/30